

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals

Untersuchung von Angiopoetin-like Protein 4,  
GDF-15 und NT-proBNP als Biomarker für  
Komorbiditäten, Schweregrad und  
Krankheitsprogression bei Patienten mit Chronisch  
Obstruktiver Lungenerkrankung – Ergebnisse der  
multizentrischen COSYCONET-Kohortenstudie

Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes

Vorgelegt von  
Johanna Maria Classen  
aus Gießen



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1	Abstract . . . . .	2
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
2.1	Hintergrund . . . . .	5
2.2	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) – Klinisches Erscheinungsbild . . . . .	5
2.3	COPD – Pathophysiologie und Klassifikation . . . . .	6
2.3.1	Pathophysiologie . . . . .	6
2.3.2	Klassifikation . . . . .	7
2.4	COPD und Komorbiditäten . . . . .	9
2.5	Biomarker . . . . .	11
2.5.1	Angiopoetin-like Protein 4 (ANGPTL4) . . . . .	11
2.5.2	Growth differentiation factor 15 (GDF-15) . . . . .	13
2.5.3	N-terminales pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>17</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
4.1	German COPD and Systemic Consequences – Comorbidities Network (COSYCONET) – Patienten . . . . .	19
4.1.1	Einschlusskriterien . . . . .	20
4.1.2	Ausschlusskriterien . . . . .	20
4.2	Material . . . . .	20
4.2.1	Geräte und Software . . . . .	21
4.2.2	Reagenzien und Kits . . . . .	21
4.3	Durchführung der Messung . . . . .	22
4.4	Datenauswertung . . . . .	25
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>27</b>
5.1	Die demographischen Ergebnisse des Patientenkollektivs . . . . .	27
5.2	Messergebnisse der Biomarker . . . . .	29
5.3	Ergebnisse der uni- und multivariablen Analyse der ANGPTL4 Konzentration . . . . .	29
5.4	Ergebnisse der uni- und multivariablen Analyse der GDF-15 Konzentration . . . . .	37
5.5	Signifikanzen in der uni- und multivariablen Analyse der NT-proBNP Konzentration . . . . .	44

<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
6.1	Angiopoetin-like Protein 4 . . . . .	49
6.2	Growth differentiation factor 15 . . . . .	52
6.3	N-terminales pro brain natriuretic peptide . . . . .	56
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>59</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Endogene und exogene Faktoren der COPD nach [6] . . . . .	7
2.2	Spirometrische Klassifikation der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung nach der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)-Gruppe [5] . . . . .	8
2.3	COPD-Assessment und Risiko. Einteilung der COPD in die vier Gruppen A, B, C und D in Abhängigkeit vom Ausmaß der Symptomatik der Einschränkung in der Lungenfunktion und der Zahl bzw. Schwere der Exazerbationen. * $\geq$ eine Hospitalisation [107] . . . . .	9
2.4	Systemische Effekte und Komorbiditäten der COPD [9] . . . . .	10
4.1	GOLD Klassifizierung der COSYCONET Patienten (2012) . . . . .	20
5.1	Verteilung des Biomarkers ANGPTL4 als Boxplot . . . . .	30
5.2	Verteilung des Biomarkers ANGPTL4 als Histogramm . . . . .	30
5.3	Korrelation der ANGPTL4 Konzentrationen und des spezifischer effektiver Atemwegswiderstand (sRAWeff.) . . . . .	31
5.4	Korrelation der ANGPTL4 Konzentrationen und des Residualvolumens . . . . .	32
5.5	Boxplot Alpha-1-Antitrypsinmangel (AATM) - ANGPTL4 Konzentration . . . . .	33
5.6	Boxplot GOLD Stadien nach Sollwert der Europäischen Gemeinschaft für Kohle und Stahl (EGKS) und ANGPTL4 Konzentration . . . . .	34
5.7	Boxplot GDF-15 Konzentration . . . . .	37
5.8	Histogramm der Verteilung der GDF-15 Konzentration . . . . .	38
5.9	Boxplot GDF-15 und Raucherstatus . . . . .	38
5.10	Verteilung der C-reaktives Protein (CRP) Konzentration und GDF-15 Konzentration als Punktwolke . . . . .	39
5.11	Verteilung der NT-proBNP und GDF-15 Konzentration . . . . .	40
5.12	GOLD Stadien und GDF-15 Konzentration . . . . .	41
5.13	Boxplot NT-proBNP Konzentration . . . . .	44
5.14	NT-proBNP Konzentration für das Gesamtkollektiv . . . . .	45
5.15	Boxplot NT-proBNP Konzentration bei Herzinsuffizienz . . . . .	46
5.16	Boxplot GOLD Stadien der NT-proBNP Konzentration . . . . .	46
6.1	hypothetische Wirkung des ANGPTL4 . . . . .	52



# Tabellenverzeichnis

4.1	Für die Biomarkermessung verwendete Geräte und Software . . . . .	21
4.2	Für die Biomarkermessung verwendete Kits und Reagenzien . . . . .	22
5.1	Häufigkeit GOLD Klassifikation ABCD . . . . .	27
5.2	deskriptive Statistik des Gesamtkollektivs . . . . .	28
5.3	Demographie der Komorbiditäten . . . . .	29
5.4	deskriptive Statistik der Biomarker . . . . .	29
5.5	Uni- und multivariable Regression von ANGPTL4 . . . . .	35
5.6	Uni- und multivariable Regression von GDF-15 . . . . .	42
5.7	Uni- und multivariable Analyse von NT-proBNP . . . . .	47





# Abkürzungsverzeichnis

<b>ABI</b>	Ankle Brachial Index
<b>AATM</b>	Alpha-1-Antitrypsinmangel
<b>AECOPD</b>	akute exazerbierte COPD
<b>ALI</b>	Lipopolysaccharid-induziertes akutes Lungenversagen
<b>ANGPTL2</b>	Angiopoetin-like Protein 2
<b>ANGPTL4</b>	Angiopoetin-like Protein 4
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>BNP</b>	B-Typ natriuretisches Peptid
<b>CAT-Score</b>	COPD Assessment Test
<b>COPD</b>	Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung
<b>COSYCONET</b>	German COPD and Systemic Consequences – Comorbidities Network
<b>CRP</b>	C-reaktives Protein
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>CVI</b>	Cardiovascular Index (beinhaltet art. Hypertonie, KHK, Myokardinfarkte, Arrhythmien, Schlaganfälle)
<b>Dest.H<sub>2</sub>O</b>	destilliertes Wasser
<b>DLCO</b>	Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid
<b>EGKS</b>	Sollwert der Europäischen Gemeinschaft für Kohle und Stahl
<b>EKG</b>	Elektrokardiogramm
<b>FEV1</b>	Einsekundenkapazität
<b>FEV1%Pred</b>	Prozent des Sollwertes des forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde
<b>FVC</b>	Forcierte Vitalkapazität
<b>GDF-15</b>	Growth differentiation factor 15
<b>GFR</b>	glomeruläre Filtrationsrate
<b>GOLD</b>	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
<b>HbA1c</b>	Hämoglobin A1c

<b>HDL</b>	High Density Lipoprotein-Cholesterin
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxie induzierter Faktor-1 $\alpha$
<b>IQR</b>	Interquartilsabstand
<b>ITGV</b>	intrathorakales Gasvolumen
<b>KHK</b>	koronare Herzkrankheit
<b>KI</b>	Konfidenzintervall
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein Cholesterin
<b>MRC</b>	Medical Research Council Dyspnea
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>NSTEMI</b>	Nicht-ST-Hebungsinfarkt
<b>NT-proBNP</b>	N-terminales pro brain natriuretic peptide
<b>NYHA</b>	New York Heart Association
<b>pAVK</b>	peripheren arteriellen Verschlusskrankheit
<b>PKY</b>	Packyears
<b>PPARs</b>	Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren
<b>RAGE</b>	Rezeptor für AGE-Produkte
<b>RV</b>	Residualvolumen
<b>SD</b>	Standard Deviation
<b>SGRQ</b>	St.George Respiratory Questionnaire
<b>SMWD</b>	6-Minuten-Gehtest
<b>sRAWeff.</b>	spezifischer effektiver Atemwegswiderstand
<b>TLCO</b>	Kohlenstoffmonoxid Diffusionskapazität
<b>BODE-Index</b>	Body Mass Index (BMI), Airflow Obstruction, Dyspnea and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease
<b>TLC</b>	totale Lungenkapazität
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>VLDL</b>	Very Low Density Lipoprotein
<b>WHO</b>	Weltgesundheitsorganisation

# 1 Zusammenfassung

Die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) steht weltweit im Fokus der medizinischen Forschung, da sie nicht nur zu den häufigsten Todesursachen zählt, sondern auch keine kausale Therapie verfügbar ist. Bisher gelang es nicht verlässliche diagnostische oder prognostische Biomarker zu finden, welche die Therapie und die Diagnostik der COPD unterstützen.

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse neuer Biomarker für die Verwendung bei der COPD. Dazu untersuchte die Kohortenstudie des German COPD and Systemic Consequences – Comorbidities Network (COSYCONET) mit Hilfe von Immunassays die Serumproben von 2741 Patienten. Der Fokus lag auf den Biomarkern Angiopoetin-like Protein 4 (ANGPTL4), Growth differentiation factor 15 (GDF-15) und N-terminales pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP). Ziel der COSYCONET-Studie war es Informationen zu Komorbiditäten, subjektiven Symptomausprägungen und den Ergebnissen klinischer Untersuchungen zu sammeln, mit Hilfe derer die Korrelation zwischen den Serumkonzentrationen der analysierten Proteine und den klinischen Parametern im Querschnitt oder der longitudinalen Analyse bestimmt werden kann.

Nach dem Erstellen einer deskriptiven Statistik, um einflussreiche Störfaktoren zu ermitteln, wurde unter Berücksichtigung dieser eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt. Die ANGPTL4 Konzentration korreliert mit den Lungenfunktionsparametern des spezifischen effektiven Atemwegswiderstands ( $sRAW_{eff}$ ), des Residualvolumens (RV) und des intrathorakalen Gasvolumens (ITGV). Zusätzlich fand sich ein Zusammenhang zwischen ANGPTL4 und der Lebensqualität gemessen mit Hilfe des St. George Respiratory Questionnaire (SGRQ) und des 6-Minuten Gehtests (SMWD). Des Weiteren korreliert die Konzentration mit den Laborparametern des CRPs (CRP) und des HDL-Cholesterins (HDL). Eine weitere Assoziation zeigt sich zwischen dem klinisch erhobenen BODE-Index und der Biomarker-Konzentration.

Bei dem gemessenen Biomarker GDF-15 ergab sich eine signifikante Assoziation mit der Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (DLCO). Zusätzlich bestehen Zusammenhänge mit den Komorbiditäten Fibrose, Sarkoidose, Herzinfarkt, arterielle Hypertonie, Venenthrombose und Diabetes mellitus. Auch dieser Biomarker korreliert mit der Lebensqualität – gemessen mit Hilfe des SGRQ und des SMWD. Der Ankle Brachial Index (ABI),

der zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos dient, weist einen Zusammenhang mit der GDF-15 Konzentration auf.

Die NT-proBNP-Konzentration zeigt keine Korrelation zu Lungenfunktionsparametern. In der multivariablen Regressionsanalyse konnten erhöhte NT-proBNP-Werte bei Patienten mit den Komorbiditäten koronare Herzkrankheit (KHK), Schlaganfall und Herzinsuffizienz gefunden werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es schwierig ist bei COPD Patienten einen lungenspezifischen, wie stabilen Biomarker zu finden. Zum einen beruht dies auf der Tatsache, dass COPD Patienten an vielen Komorbiditäten leiden. Es ist schwierig zu differenzieren, ob die COPD die primäre Ursache der erhöhten Serumkonzentration darstellt, oder die Komorbidität. Zweitens ist die COPD als sehr variable Krankheit bekannt, wodurch sich ein einheitlicher Biomarker nur schwerlich finden lässt. Als dritter Punkt ist zu nennen, dass in dieser Arbeit ein Querschnitt der COSYCONET Studie betrachtet wird, anhand dessen keine Aussage zum Verlauf der Biomarker Konzentration getroffen werden kann.

Insgesamt zeigt sich, dass Serumproteine sinnvolle Biomarker zur Beurteilung der COPD sein können.

### 1.1 Abstract

The chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is focused in medical research worldwide, as it is one of the leading causes of death and there is no causal therapy available. So far, it has not been possible to find reliable diagnostic and sparse prognostic laboratory parameters that support the therapy and diagnosis of COPD.

The topic and aim of this research is finding new biomarkers for patients with COPD. Therefore, the German COPD and Systemic Consequences – Comorbidities Network (COSYCONET) study includes a large cohort with 2741 patients from which we took serum blood samples. Using immunoassays we analyzed the serum proteins angiopoetin-like-protein 4 (ANGPTL-4), growth/differentiation factor 15 (GDF-15) and N-terminal prohormone of brain natriuretic peptide (NT-proBNP).

The aim of this research was to collect information about comorbidities, subjective symptom manifestations and the results of clinical examinations, which can be used to determine the correlation between the serum concentrations of the analyzed proteins and the clinical parameters in cross-sectional or longitudinal analysis. Afterwards we analyzed statistically the measured values regarding individual confounder for every biomarker.

We could find correlations between ANGPTL4 and the parameters of lung functions specific effective airway resistance (sRAWeff.) , residual volume (RV) and intrathoracic gas volume (ITGV). Additional correlations could be found between the ANGPTL4 concentration and the quality of life as measured by the St.George's Respiratory Questionnaire (SGRQ) and the 6-minute walk (SMWD). Furthermore, the concentration correlates with the laboratory parameters of C-reactive protein (CRP) and HDL cholesterol. Another association shows up between the clinically raised BODE index and ANGPTL4.

The measured biomarker GDF-15 showed a significant association with the carbon monoxide diffusion capacity (Diffusionskapazität für Kohlenmonoxid (DLCO)). In addition, there are correlations with the comorbidities fibrosis, sarcoidosis, heart attacks, arterial hypertension, venous thrombosis and diabetes mellitus. This biomarker also correlates with the quality of life – measured with the aid of SGRQ and the SMWD. The ankle-brachial index (ABI), which is used to estimate the cardiovascular risk, has a correlation with the GDF-15 concentration.

There is no correlation between the NT-proBNP concentration and pulmonary function parameters. In the multivariable regression analysis, the comorbidities coronary heart disease, strokes and heart failure remained significant. To summarize, it can be said that it is difficult to find a stable lung specific biomarker for patients with COPD.

On the one hand, this is due to the fact that COPD patients suffer from many comorbidities. It is difficult to differentiate whether COPD is the primary cause of increased serum concentration or comorbidity. On the other hand, COPD is known to be a very variable disease, making it difficult to find a consistent biomarker.

Additionally, this thesis looks at a cross-sectional study that does not allow conclusions to be drawn about the course of biomarker concentration.

Overall, it is shown that serum proteins can be useful biomarkers for assessing patients with COPD.



## 2 Einleitung

### 2.1 Hintergrund

Gegenstand dieser wissenschaftlichen Arbeit ist die Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind weltweit 65 Millionen Menschen erkrankt und man nimmt an, dass sie 2030 zu den dritt häufigsten Todesursachen zählen wird [104].

Die COPD ist eine chronische Erkrankung, die durch inhalative Noxen, vor allem Zigarettenrauch, hervorgerufen wird und aus der eine nicht reversible Atemwegsobstruktion hervorgeht. Neben exogenen Einflüssen können auch endogene Einflüsse, wie der genetisch vererbte Alpha-1-Antitrypsinmangel (AATM), den Phänotyp der COPD beeinflussen [99].

Die molekulare und mechanistische Pathogenese der COPD ist noch nicht ausreichend erforscht und weiterhin versucht man – unter anderem über das Identifizieren von Biomarkern – molekulare Therapiemöglichkeiten zu finden.

### 2.2 COPD – Klinisches Erscheinungsbild

Die COPD ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Lunge, die mit einer Erhöhung des Atemwegswiderstandes einhergeht. Die Obstruktion der Atemwege ist progredient und entsteht durch das sogenannte Atemwegs-Remodelling des Gewebes, welches hauptsächlich durch inhalative Noxen – vor allem Nikotinabusus – induziert wird.

Definiert ist die COPD zusätzlich durch die WHO als nicht reversible Erkrankung [105]. Die Diagnose der COPD wird mit Hilfe der Spirometrie gestellt und manifestiert sich in einer verminderten Einsekundenkapazität (FEV<sub>1</sub>), einem erhöhten Residualvolumen (RV), einem erhöhten intrathorakalen Gasvolumen (ITGV) und einer verminderten Diffusionskapazität [97, 93]. Der Phänotyp der COPD ist jedoch von Individuum zu Individuum verschieden und stellt sich klinisch auch unterschiedlich dar.

## 2.3 COPD – Pathophysiologie und Klassifikation

### 2.3.1 Pathophysiologie

Die Entstehung der COPD, sowie deren Phänotyp und Schweregrad werden sowohl von endogenen als auch von exogenen Faktoren beeinflusst.

Die Lunge stellt eine primäre Eintrittspforte für inhalative Noxen dar. Hierzu zählen in den meisten Teilen der Welt der Tabakrauch. Aber auch die Inhalation des Rauches von elektronischen Zigaretten oder von erwärmtem Tabak zeigt ein deutliches toxisches Potential für die Lunge [35, 32, 10]. Zu COPD ähnlichen Lungenerkrankungen führen ebenso die Inhalationen von Feinstaub oder Rauch von verbranntem organischen Material, da auch dies zu einer chronischen Entzündung der Lunge führt [77].

Bislang konnten keine eindeutigen Zielgene lokalisiert werden, die das Krankheitsrisiko determinieren oder auf einen bestimmten Phänotyp der COPD hinweisen. Zwar identifizierte man bereits Gen-Cluster, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert werden können [88, 56], der AATM ist jedoch der einzige gesicherte genetische Einflussfaktor in der Entstehung der COPD. Hierbei handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Erkrankung, die durch eine Mutation im SERPINA-1-Gen entsteht. Der daraus resultierende verminderte Blutspiegel an AATM, einem Protease-Inhibitor, führt zu einem verminderten Abbau von gewebsdestruktiven Enzymen. Vor allem die neutrophile Elastase wirkt proteolytisch und ist bei unzureichender Neutralisierung durch Antiproteasen an der Zerstörung des Lungenparenchyms beteiligt [70].

Die inhalative Noxe löst mit der Desposition von Rauchpartikeln in den Atemwegen Entzündungsprozesse aus, bei der endogene (genetische) Faktoren den klinischen Phänotyp mitbestimmen. Mittels Chemotaxis werden neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen aktiviert und zur Migration in das Lungenparenchym stimuliert. Diese Effektorzellen setzen Entzündungsmediatoren und gewebsdestruierende Enzyme frei. Weitere sezernierte Botenstoffe dieser Zellen führen zur Rekrutierung weiterer Effektorzellen wie z.B. Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Bei COPD Patienten konnte, im Gegensatz zu Gesunden, eine 5–10-fach höhere Konzentration an Makrophagen in der bronchoalveolären Lavage gefunden werden [8]. Die hieraus resultierende inflammatorische Reaktion führt zu einem irreversiblen Umbau des Parenchyms, da sich die geschädigten Zellen vor allem durch Fibrosierung regenerieren [6].

Durch die chronische Entzündung und die Rauchexposition kommt es zu einer Hyperplasie der Becherzellen im Epithel. Diese führt zu einer vermehrten Sekretion des Atemwegssekrets und beeinträchtigt die mukoziliäre Clearance [75]. Keime können sich somit besser an die Oberfläche des Respirationstraktes anheften und das Infektionsrisiko



ist erhöht. Zusätzlich bietet der durch das Airway Remodelling veränderte Mukus einen guten Nährboden für pathogene Keimbildungen [83].

Darüber hinaus ist ein weiterer Pathomechanismus bekannt, indem sich der Nikotinabusus negativ auf den oxidativen Stress im Körper auswirkt. Durch Inhalation von Zigarettenrauch gelangen verschiedene freie Radikale und Oxidantien in die Lunge. So entsteht ein Ungleichgewicht im Redoxstatus, was unter anderem zu einer Zunahme von Lipidoxidationsprodukten führt, welche vermehrt Entzündungsmediatoren aktivieren [69, 33]. Zusätzlich kann es zur Inaktivierung von Antiproteasen durch oxidativen Stress kommen, wodurch es zu Epithelschäden der Lunge, Schleimhauthypersekretion und erhöhter Infiltration von Neutrophilen in das Lungengewebe kommt, die proinflammatorische Mediatoren sezernieren [74].

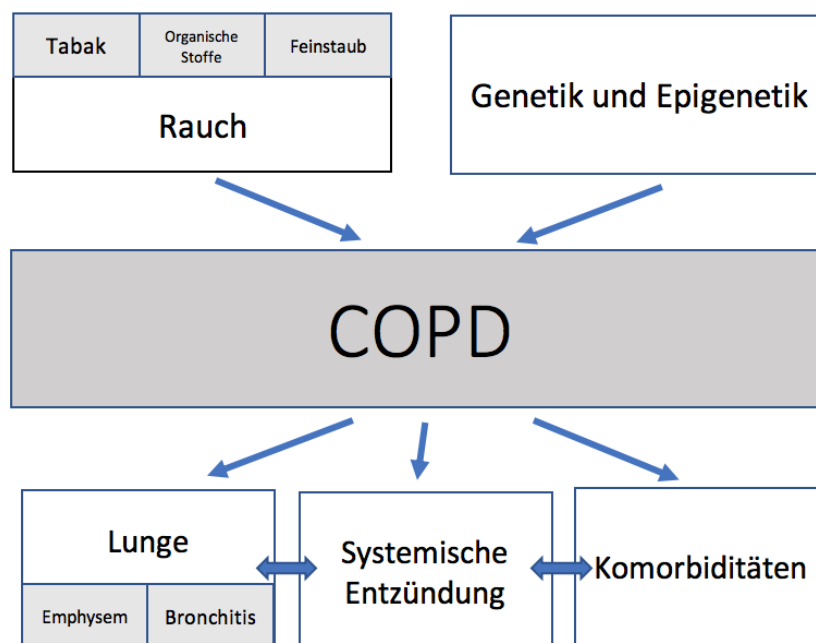


Abbildung 2.1: Endogene und exogene Faktoren der COPD nach [6]

### 2.3.2 Klassifikation

Die Klassifikation der COPD erfolgt nach den Kriterien der GOLD in vier Schweregrade. Ursprünglich diente die Lungenfunktionsmessung als Grundlage dieser Einteilung. Es fließt der Tiffenau-Index ( $FEV_1$  / Forcierte Vitalkapazität (FVC)) und die  $FEV_1$  mit ein. Beträgt der postbronchiodilatatorische Tiffenau-Index weniger als 0,7, so muss, nach Ausschluss der Differentialdiagnosen, eine COPD in Betracht gezogen werden [38]. Um die Variabilität der Krankheit besser darzustellen und den Patienten individuellere Therapien anbieten zu können, wurde 2011 eine erweiterte GOLD Stadien Einteilung

## 2 Einleitung

entwickelt.

2004 zeigte eine im New England Journal publizierte Studie von Celli *et al.*, dass der BODE-Index weitaus mehr mit der Mortalität der Patienten korrelierte als die FEV<sub>1</sub> [16]. In der erweiterten ABCD-Klassifikation werden nun mehrere Faktoren berücksichtigt: Symptome des Patienten, Spirometrie, Exazerbationsrate und die subjektiv bewertete Beeinträchtigung. Hierfür wird der COPD Assessment Test (CAT-Score) oder der Medical Research Council Dyspnea (MRC) verwendet, in welchem die Erkrankten ihre Symptome subjektiv bewerten können.

Die GOLD Stadieneinteilung kann nach FEV<sub>1</sub> oder anhand der Exazerbationsrate in den letzten zwölf Monaten erfolgen. Ist eine eindeutige Einteilung nicht möglich, so wird empfohlen, von dem höheren Risiko auszugehen [47].

2017 wurde die Einteilung nach GOLD neu überarbeitet. Die mit der Spirometrie gemessenen Daten dienen künftig primär dazu die COPD zu diagnostizieren. Es wird bei entsprechender Symptomatik und Anamnese weiterhin bei einem Tiffenau-Index von  $< 0,7$  von einer COPD ausgegangen.

Auch die Schweregradeinteilung erfolgt anhand der Lungenfunktion. Sie reicht weiterhin von GOLD 1 (FEV<sub>1</sub>  $\geq 80\%$ ) bis GOLD 4 (FEV<sub>1</sub>  $< 30\%$ ) und dient dazu, das Krankheitsstadium abzuschätzen und den Verlauf kontrollieren zu können.

<b>TABELLE</b>		
<b>Klassifikation der Lungenfunktion (nach bronchodilatatorischer FEV<sub>1</sub>)</b>		
<b>bei Patienten mit FEV<sub>1</sub>/FVC <math>&lt; 0,70</math>:</b>		
<b>GOLD 1:</b>	mild	FEV <sub>1</sub> $\geq 80\%$ vorhergesagt
<b>GOLD 2:</b>	moderat	$50\% \leq \text{FEV}_1 < 80\%$ vorhergesagt
<b>GOLD 3:</b>	schwer	$30\% \leq \text{FEV}_1 < 50\%$ vorhergesagt
<b>GOLD 4:</b>	sehr schwer	FEV <sub>1</sub> $< 30\%$ vorhergesagt

Abbildung 2.2: Spirometrische Klassifikation der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung nach der GOLD-Gruppe [5]

Die 2017 erschienene neue GOLD Klassifikation besteht demnach aus zwei Teilen. Zum einen aus dem Maß der Flusslimitierung, ausgerechnet durch die Prozent des Sollwertes des forcierten expiratorischen Volumens in einer Sekunde (FEV<sub>1</sub>%Pred) und auf der anderen Seite aus einer zweidimensionalen Vierfeldertafel, auf deren Achsen sich die Anzahl der Exazerbationen und die Symptomlast abbilden. Zur Symptomeinschätzung

werden weiterhin die subjektiven Fragebögen CAT-Score und MRC verwendet [5, 94]. In der 2018 erschienenen Leitlinie werden Exazerbationen in „leicht“, „mittelschwer“ und „schwer“ eingeteilt, abhängig davon, welche Therapiemaßnahmen notwendig sind [99].

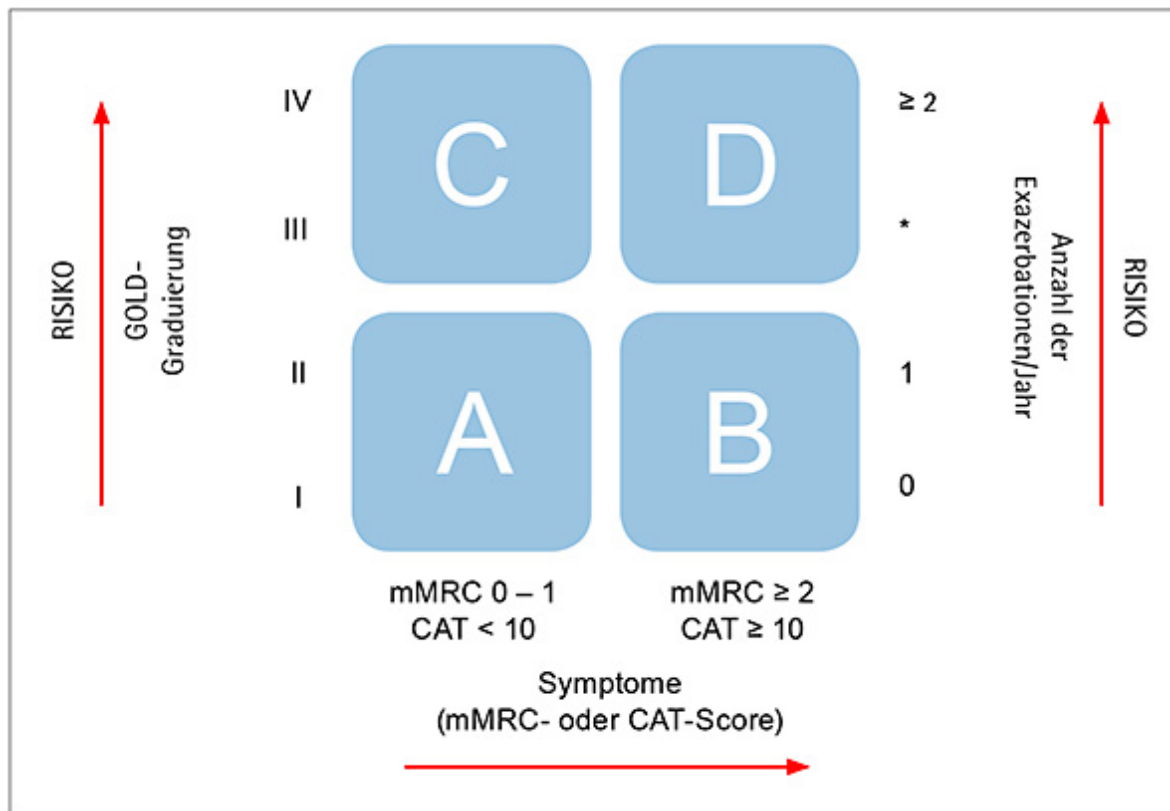


Abbildung 2.3: COPD-Assessment und Risiko. Einteilung der COPD in die vier Gruppen A, B, C und D in Abhängigkeit vom Ausmaß der Symptomatik der Einschränkung in der Lungenfunktion und der Zahl bzw. Schwere der Exazerbationen. \*  $\geq$  eine Hospitalisation [107]

## 2.4 COPD und Komorbiditäten

Die Entzündungsprozesse, die durch die COPD ausgelöst werden, beschränken sich nicht nur auf die Lunge. So konnten erhöhte Ausgangswerte von zirkulierenden Entzündungsmarkern im Serum von COPD Patienten gemessen werden. Es ist jedoch nicht klar, ob dies aus einem systemischen Entzündungsprozess resultiert oder als sekundäre Folge der pulmonalen Entzündung der Lunge zu bewerten ist. Dies bleibt weiterhin eine nicht ausreichend beantwortete Frage. Bei COPD Patienten sind erhöhte CRP-, Fibrinogen-, Leukozyten- und TNF- $\alpha$  Konzentrationen im Serum zu messen [31, 3].

Die häufigsten Komorbiditäten der COPD sind Diabetes mellitus, Depression, Gewichtsabnahme, Lungenkarzinom, das metabolische Syndrom, Muskelatrophie, normozytäre

## 2 Einleitung

Anämie, obstruktives Schlafapnoe Syndrom, Osteoporose, pulmonale Hypertonie und kardiovaskuläre Erkrankungen [9].

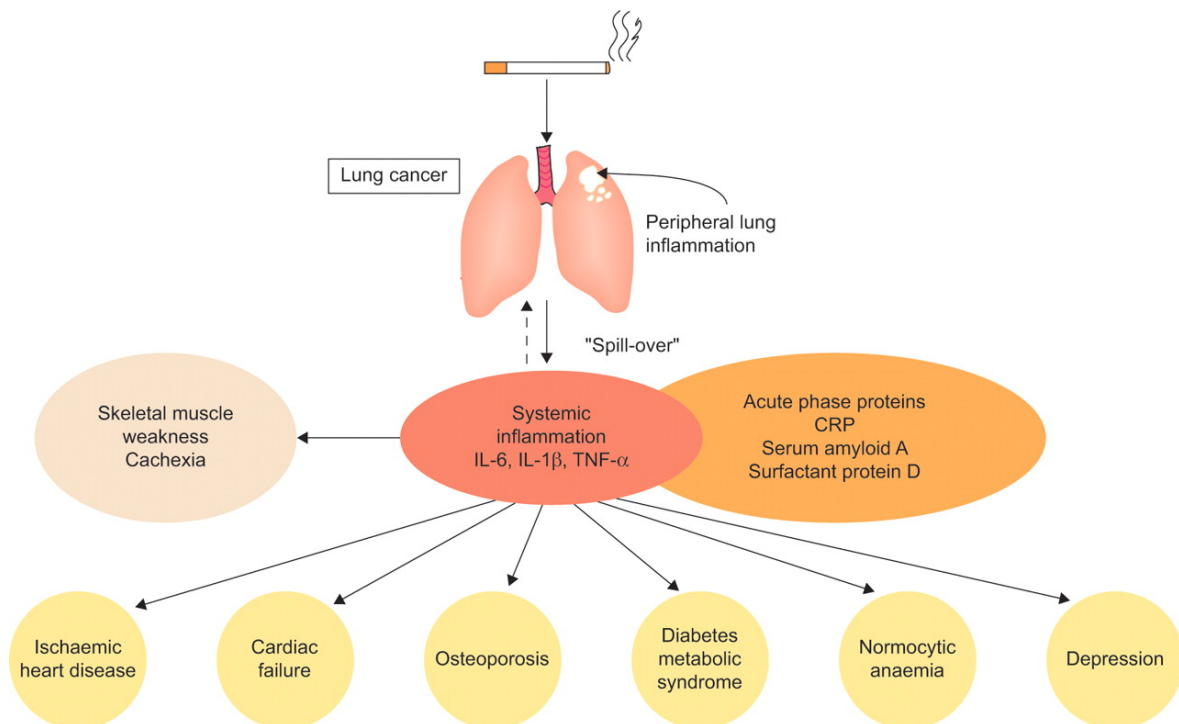


Abbildung 2.4: Systemische Effekte und Komorbiditäten der COPD [9]

Vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen haben eine gemeinsame Suszeptibilität und gemeinsame Risikofaktoren (Alter, BMI, Rauch). Die nachgewiesenen systemischen Entzündungsmediatoren können jedoch auf einen Zusammenhang hinweisen.

Das veränderte Mikrobiom der Lunge von COPD Patienten und die chronische Entzündung führen zusätzlich zu einem deutlich erhöhten Risiko ein Lungenkarzinom zu entwickeln [93, 20].

Es wird empfohlen alle Komorbiditäten leitliniengerecht zu behandeln, unabhängig von der Diagnose der COPD – und *vice versa* [5].

Mit der Anzahl der Begleiterkrankungen steigt das Mortalitätsrisiko und das Risiko für Krankenhausaufenthalte [59]. Die dadurch resultierende erhöhte finanzielle Belastung des Gesundheitssystems lässt die Komorbiditäten immer mehr in den Mittelpunkt des gesundheitsökonomischen Interesses und der wissenschaftlichen Forschung rücken.

Um die begleitenden Erkrankungen besser erfassen zu können wurden Langzeitstudien etabliert (zum Beispiel COSYCONET).

In den Ländern der Europäischen Union wurden 2011 geschätzt Ausgaben in Höhe von 23,3 Milliarden Euro für die Versorgung von COPD Patienten erfasst. Indirekte Kosten (wie zum Beispiel durch die Krankheit verursachte Arbeitsunfähigkeit oder Frühbe-

rentung) beliefen sich auf circa 25,1 Milliarden Euro. Durch die steigende Prävalenz der COPD sind in den kommenden Jahren noch weitaus höhere Belastungen für die Gesundheitssysteme zu erwarten [100].

Klinische Einflussvariablen wie Alter, Nikotinabusus, Exazerbationen, BMI und Dyspnoe konnten in früheren Studien als Einflussvariablen identifiziert werden. Dennoch besteht ein großer Anteil noch nicht begründeter Variabilität, welcher das Interesse auf die molekulare Ebene der Biomarker lenkt [109].

## 2.5 Biomarker

Biomarker können in Krankheitsprozessen verschiedene pathophysiologische Vorgänge reflektieren und ein Hinweis auf Schädigung, Entzündungsprozesse und klinisch relevante Informationen liefern [86].

Nach der *Biomarker Definitions Working Group* ist ein Biomarker ein objektiv messbares Charakteristikum und ein Indikator von physiologischen und pathologischen Prozessen oder er spiegelt eine Antwort auf eine pharmakologisch therapeutische Intervention wieder [21].

Bezüglich der COPD ist es bislang noch nicht möglich gewesen einen Biomarker zu etablieren, der im klinischen Alltag signifikante Aussagekraft besitzt.

### 2.5.1 Angiopoetin-like Protein 4 (ANGPTL4)

Angiopoetine sind sezernierte Akute-Phase-Proteine, die eine ähnliche Struktur besitzen. Sie weisen eine charakteristische C-terminale Fibrinogen Domäne und eine N-terminale Coiled-Coil-Domäne auf [39].

Sie werden von sieben verschiedenen Genen kodiert. Die höchste Expressionsrate von ANGPTL4 wurde im menschlichen Körper in der Leber gefunden. Es wurde jedoch auch in Haut, Niere, Fettgewebe, Blutplasma, Dünndarm, Plazenta und verschiedenen Tumoren nachgewiesen [51].

Es konnte gezeigt werden, dass unter hypoxischen Bedingungen die Produktion von ANGPTL4 durch die Aktivierung des Hypoxie induzierten Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) und von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) induziert wird, was ANGPTL4 besonders in Hinblick auf COPD Patienten interessant werden lässt [43, 62]. HIF-1 $\alpha$  ist ein sauerstoffabhängiger Transkriptionsfaktor, der unter hypoxischen Bedingungen von verschiedenen Zellen sezerniert wird und unter anderem die Expression des

## 2 Einleitung

Erythropoetin-Gens induziert [80].

PPARs sind intrazelluläre Rezeptoren, die durch Liganden aktiviert werden und ebenfalls als Transkriptionsfaktoren fungieren können.

Zusätzlich wirkt es als Serumhormon direkt auf den Fettstoffwechsel. Im Serum führt ANGPTL4 zur Inhibition der Lipoprotein-Lipase und damit zur Erhöhung des Serum-Triglycerid Spiegels [72]. Erhöhte Triglycerid-Spiegel gelten als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen, welche häufig koexistent bei COPD-Patienten sind.

Es wurde von Stitzel *et al.* gezeigt, dass eine Inaktivierung durch Mutation des ANGPTL4-Gens zu einem verringerten Risiko führt, eine KHK oder Atherosklerose zu entwickeln [66].

Als ein zusätzlicher metabolischer Effekt von ANGPTL4 konnte eine verstärkte Fettsäure Oxidation und Lipolyse nachgewiesen werden. Eine Überexpression von ANGPTL4 im Fettgewebe konnte zu einer deutlichen Reduktion des Fettgewebes in genmodifizierten Mäusen führen [58].

In einer prospektiven Kohortenstudie mit 160 Probanden fiel 2016 auf, dass Patienten mit COPD, verglichen mit Probanden ohne COPD, einen signifikant erhöhten ANGPTL4 Spiegel aufwiesen [103]. Inwieweit die Serumkonzentration bei Individuen mit einer COPD mit klinisch relevanten Parametern assoziiert werden kann, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Das pleiotrope Protein konnte zusätzlich in mehreren aktuellen Studien auch als Einflussfaktor auf Entzündungen identifiziert werden [91, 37], welche einen wichtigen Bestandteil der Pathogenese der COPD widerspiegeln.

ANGPTL4 konnte im Tiermodell eine Bedeutung bei entzündlich bedingten Lungenversagen zugeschrieben werden – so etwa eine Beteiligung beim Lipopolysaccharid-induzierten akuten Lungenversagen (ALI) und dem daraus resultierendem Umbau des Lungengewebes. Mäuse mit einem Knockdown des ANGPTL4-Gens zeigten eine geringer ausgeprägte Inflammation des Lungenparenchyms, weniger Gewebeschäden, eine erniedrigte Permeabilität und eine niedrigere Mortalitätsrate [36].

ANGPTL4 wird auch von malignen Zellen sezerniert. So erhöht es in metastasierenden Prozessen die vaskuläre Permeabilität und die Invasivität der malignen Zellen. Zusätzlich schützt es diese Zellen vor Apoptose [68]. Patienten mit COPD haben ein hohes Risiko an einem Lungenkarzinom zu erkranken [20]. Die Bedeutung der ANGPTL4 Konzentration für das mit dem COPD assoziierten Bronchialkarzinom ist jedoch noch ungeklärt.

Des Weiteren beschleunigt es als Protein den Wundverschluss und vermindert die Kollagenexpression in Tierversuchen [89].

Bislang konnte in keiner Studie die Variabilität der ANGPTL4 Konzentration in der Gruppe der COPD Patienten untersucht werden. Mit Hilfe der COSYCONET Studie

steht ein sehr heterogenes Kollektiv an COPD Patienten zur Verfügung. Durch die anamnestisch erfragten Vorerkrankungen können auch kardiovaskuläre Erkrankungen in Analyse der ANGPTL4 Konzentrationen berücksichtigt werden. In wie weit ANGPTL4 mit Lungenfunktionsparametern, GOLD Stadien, Packyears (PKY) und Komorbiditäten innerhalb der Gruppe an COPD erkrankten Patienten korreliert, wurde bis jetzt noch nicht geklärt und ist Gegenstand dieser Arbeit.

### 2.5.2 Growth differentiation factor 15 (GDF-15)

Beim GDF-15 handelt es sich um ein Zytokin der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta$ , welches an entzündlichen und apoptotischen Prozessen in verletztem Gewebe hochreguliert wird und an Krankheitsprozessen beteiligt ist.

Es ist bekannt, dass erhöhte GDF-15 Serumkonzentrationen mit der Exazerbationsfrequenz bei Patienten mit COPD assoziiert sind [63]. Die Bedeutung bei Patienten mit stabiler COPD ist jedoch noch unklar.

Unter physiologischen Bedingungen wird es im menschlichen Organismus nur in geringen Mengen gebildet. Findet jedoch ein entzündlicher oder destruierender Vorgang statt, so wird es vermehrt in Endothelzellen, Kardiomyozyten, Gefäßmuskelzellen, Adipozyten und Makrophagen sezerniert. Bezüglich seiner Expression in der Lunge ist zum jetzigen Zeitpunkt noch wenig bekannt [79].

Erhöhte Plasmaspiegel des GDF-15 zeigten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko auf, das mit klinischen, funktionellen und anatomischen Parametern und der Prognose korrelierte [50].

GDF-15 wurde als prognostischer Marker bei der KHK oder herzinsuffizienten Patienten bereits anerkannt [49]. Auch in einer Langzeitstudie korrelierten erhöhte GDF-15 Werte bei Frauen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse [11]. Inwiefern der Biomarker auch bei Patienten mit COPD, die ein kardiovaskuläres Risikoprofil zeigen, assoziiert werden kann, ist daher von Interesse der vorliegenden Arbeit.

*In vitro* induziert Zigarettenrauch die Produktion von GDF-15. In Atemwegsepithelien von rauchenden COPD Patienten wurde eine erhöhte GDF-15 Expression, verglichen zu den Epithelien nicht rauchender COPD Patienten, gemessen [18, 108]. Korrelationen zwischen PKY, Nikotinkarenz und anhaltendem Nikotinabusus sind daher möglich und von Interesse bezüglich der COPD Progression.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass erhöhte GDF-15 Spiegel in Tumorgewebe zu einem erhöhten Rezidivrisiko und zu einer reduzierten Gesamtüberlebenszeit führt [98]. So war die Empfindlichkeit von GDF-15 als Biomarker gegenüber den etablierten CEA-

Tumormarkern bei Kolonkarzinom-Patienten gleichwertig anzusehen [98]. Auch bei der COPD könnte GDF-15 eine Rolle bei der Entstehung des assoziierten Bronchialkarzinoms spielen und weckt daher das Interesse der Pneumologen.

Bei der Messung der GDF-15-Werte bei COPD Patienten fehlen Informationen über die Schwankungen des Wertes innerhalb der Gruppe an Erkrankten. Kardiovaskuläre Erkrankungen können durch die erhobenen Daten in der COSYCONET Studie identifiziert und als Störfaktor berechnet werden, da eine Erhöhung des Wertes bei kardiovaskulären Ereignissen bereits bekannt ist. Ob die gemessene GDF-15 Konzentration nicht nur mit den Exazerbationen – wie Mutlu *et al.* [63] herausfanden – sondern auch mit Lungenfunktion und Krankheitsstadium korrelieren, konnte in der COSYCONET Studie untersucht werden.

### 2.5.3 N-terminales pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP)

B-Typ natriuretisches Peptid (BNP) und NT-proBNP sind seit längerer Zeit anerkannte Herzinsuffizienz Biomarker und werden im klinischen Alltag verwendet.

BNP wird von seinem Vorläuferhormon pro-BNP abgespalten, einem 108 Aminosäuren langen Protein, welches von Myozyten sezerniert wird und anschließend in BNP und das 76 Aminosäuren lange N-terminale Fragment (NT-proBNP) gespalten wird. Als Biomarker der Herzinsuffizienz korrelieren sie mit dem New York Heart Association (NYHA) Stadium und werden vor allem zur Risikobewertung, zur Verlaufskontrolle und als prognostische Marker eingesetzt [60].

Auch bei COPD Patienten ohne Herzinsuffizienz konnten erhöhte BNP Spiegel gemessen werden. Das Cor pulmonale, pulmonale Hypertension und Hypoxie stimulieren die Sekretion von BNP aus dem rechten Herzen [25, 52, 15].

Mehrere Studien befassten sich mit dem Zusammenhang zwischen Prognose der COPD und der messbaren NT-proBNP Konzentration. So wurde in einer prospektiven, unizentrischen Studie die NT-proBNP Konzentration bei stabilen COPD Patienten bestimmt, da man einen Zusammenhang mit der Mortalität vermutete. Dieser Zusammenhang stellte sich als nicht signifikant heraus [30].

Hoiseth *et al.* konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem NT-proBNP Spiegel und dem Langzeitüberleben bei Patienten mit akuter COPD Exazerbationen nachweisen – circa 12 % der Patienten hatten jedoch keine durch die Spirometrie gesicherte COPD [42].

In einer Metaanalyse fiel auf, dass die größten Korrelationen zwischen NT-proBNP und COPD auf der Koexistenz von linksventrikulären Dysfunktionen beruhen [12].



2017 wurde in einer retrospektiven Studie von Adrish *et al.* unter Berücksichtigung der Störfaktoren erneut eine Korrelation zwischen NT-proBNP und COPD gefunden. Bei 167 COPD Patienten konnten auch hier keine signifikanten Zusammenhänge zwischen GOLD Stadien oder Komorbiditäten und der NT-proBNP Konzentration gefunden werden. Jedoch war die Dauer der Hospitalisierung und den intensivstationären Aufenthalten bei erhöhten NT-proBNP Spiegeln signifikant erhöht [2].

In der COSYCONET Studie kann nun ein weiteres Spektrum an COPD Patienten unter Berücksichtigung der kardiovaskulären Störfaktoren betrachtet werden, weshalb NT-proBNP Gegenstand dieser Arbeit ist.



# 3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es Biomarker zu eruieren, die bezüglich der COPD als prognostisch, diagnostisch oder prädiktive Marker dienen und die helfen können, Patienten an eine frühzeitige individuelle Therapie heranzuführen.

Während die Spirometrie eine wichtige objektive Rolle in der Diagnostik der COPD spielt, bleibt weiterhin die Ursache der verschiedenen klinischen Phänotypen ungeklärt. Dementsprechend ist es umso bedeutsamer prädiktive Biomarker zu finden, die helfen, die Heterogenität der COPD zu verstehen. Ein besseres Verständnis der Krankheit und eine Optimierung der Prävention und Therapie stehen hierbei im Vordergrund.

In der groß angelegten multizentrischen Kohortenstudie COSYCONET war es möglich, nicht nur die Biomarkerkonzentrationen bezüglich des Krankheitsprogresses zu analysieren, sondern dabei auch Rücksicht auf vorhandene Komorbiditäten, die Lungenfunktion, die Laborwerte und die körperliche Belastbarkeit zu nehmen. Folgende Fragen stehen im Mittelpunkt dieser Arbeit:

1. Korreliert die Lungenfunktion und das Krankheitsstadium der Patienten signifikant mit einem der drei Biomarker Konzentrationen?
2. Kann das Akute-Phase-Protein ANGPTL4 aufgrund seiner Beteiligung an inflammatorischen Prozessen mit der Exazerbationsrate der Patienten in Verbindung gebracht werden?
3. Geht die Konzentration des Zytokins GDF-15 mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko der Patienten einher?
4. Hat der bereits anerkannte Herzinsuffizienz-Biomarker NT-proBNP auch eine Aussagekraft hinsichtlich der Lungenfunktion, Exazerbationsrate und des Krankheitsprogresses, oder beschränkt sich seine Korrelation auf kardiovaskuläre Komorbiditäten?



## 4 Material und Methoden

### 4.1 COSYCONET – Patienten

Die groß angelegte, multizentrische Kohortenstudie COSYCONET umfasst 2741 Patienten, die von Anfang des Jahres 2012 bis zum Ende des Jahres 2015 an der Studie an 31 Studienzentren teilnahmen. Alle Patienten sind über 40 Jahre alt und haben eine ärztlich diagnostizierte COPD [46].

Die Patienten wurden zum Zeitpunkt 0, dem Beginn der Studie, sowie 6, 18, 36 und 54 Monate nach Erstuntersuchung erneut zur Nachbeobachtung eingeladen, wobei auch neue Blutproben entnommen wurden. Diese Probenentnahmen erfolgten mit Hilfe von standardisierten Protokollen, die den Ablauf der Entnahme und die Aufbewahrung vorgaben. Die hier verwendeten Proben für die durchgeführten Messungen beziehen sich auf den Baseline-Datensatz [45], welcher zum Zeitpunkt 0 der Studie abgenommen wurde. Die Komorbiditäten wurden über einem anamnestischen Fragebogen identifiziert. Für die COSYCONET Studie wurde eine Biomaterial Datenbank etabliert, um die Identifikation der Proben zu gewährleisten und ihre Qualität zu wahren. Zusätzlich wurde eine Bild-Bank eingerichtet.

In den Studienzentren wurden, um Komorbiditäten zu erfassen, standardisierte Interviews geführt und Fragebögen von den Studienteilnehmern ausgefüllt. Unter anderem wurden hier Informationen wie Alter, Geschlecht, Bildungsgrad, BMI und Raucherstatus erfragt. Auch bei der Frage nach Komorbiditäten wurden maligne Erkrankungen, Diabetes mellitus, Apoplexe, Myokardinfarkte und Arthritiden erfasst. 95 Patienten mit fehlenden Angaben mussten ausgeschlossen werden [101].

Auch eine große Anzahl an klinischen Parametern wurde während der Besuche der Patienten erfasst. Hierzu gehörten unter anderem die Anamnese und Vorgeschichte, 6-Minuten-Gehtest (SMWD), Elektrokardiogramm (EKG), Lungenfunktionsuntersuchungen und Blutproben. Falls Computertomographie (CT) oder Magnetresonanztomographie (MRT) vorlagen, wurden auch diese in die Datenbank eingegeben.

An allen teilnehmenden Studienzentren wurde die Studie durch ein Ethikkomitee genehmigt, eine schriftliche Einverständniserklärung der Patienten lag vor.

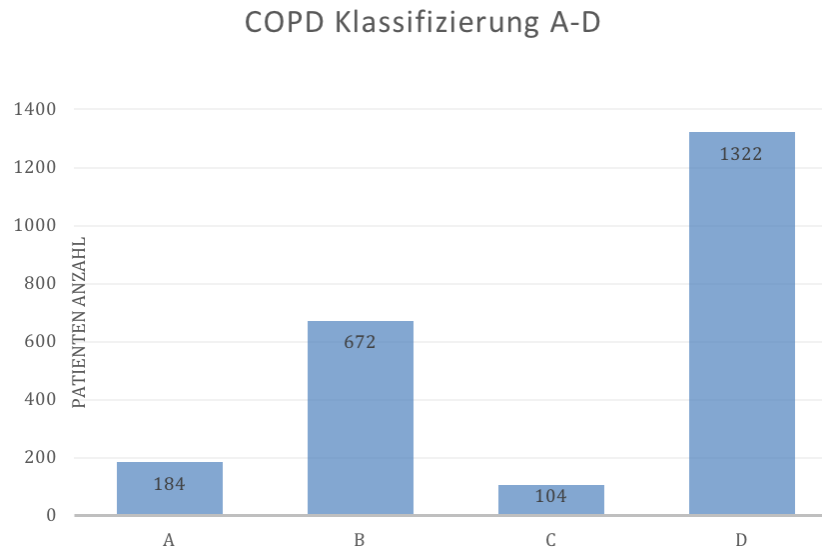


Abbildung 4.1: GOLD Klassifizierung der COSYCONET Patienten (2012)

### 4.1.1 Einschlusskriterien

Sowohl Männer, als auch Frauen wurden in die COSYCONET Studie eingeschlossen. Als Einschlusskriterium galt ein Alter von mindestens 40 Jahren oder mehr, eine COPD musste gemäß den GOLD-Richtlinien ärztlich diagnostiziert worden sein.

Jeder Patient erklärte sich vor dem Einschluss in die Studie schriftlich einverstanden und stellte sich für eine Studiendauer von 18 Monaten mit insgesamt drei Visiten zur Verfügung.

Grundvoraussetzung für die Teilnahme war die Fähigkeit, das Studienprotokoll geistig und physisch erfüllen zu können [13].

### 4.1.2 Ausschlusskriterien

Zu den Ausschlusskriterien der Studie zählen erfolgte Lungentransplantationen, Malignitäten im Bereich der Lunge und lungenvolumenreduktionschirurgische Eingriffe. Zusätzlich musste ein stabiler Gesundheitszustand während der Untersuchung vorliegen und moderate beziehungsweise schwere Exazerbationen mindesten vier Wochen zurückliegen [13].

## 4.2 Material

In den folgenden zwei Punkten werden die verwendeten Geräte und Reagenzien tabellarisch dargestellt.

### 4.2.1 Geräte und Software

Tabelle 4.1 führt die verwendeten Messgeräte und Software auf.

Tabelle 4.1: Für die Biomarkermessung verwendete Geräte und Software

Gerät/Software	Art/Name	Hersteller
Inkubator	Environmental Shaker-Incubator ES-20	Grant Instruments (England, Cambridge)
Orbital-Shaker	Titramax 101	Heidolph (Deutschland, Schwabach)
Vortex-Mixer	D-6012	neoLab (Deutschland, Heidelberg)
Magnetplatte und Sicherheitshinweis	Warning / Strong Magnets Labels	Clarion Safety Systems (USA, Pennsylvania, Milford)
Pipette Eppendorf	Research 1000 µl	Eppendorf (Deutschland, Hamburg)
Pipette Eppendorf	Research 200 µl	
Mehrkanal-Pipette	FINNPIPETTE 30 µl to 300 µl	Thermo Fisher Scientific (USA, Waltham)
Pipettenaufsatz 1000 µl	Diamond D1000	Gilson (USA, Middleton)
Pipettenaufsatz 200 µl	Diamond D200	
Reagiergefäß 1,5 ml	Micro tube 1,5 ml	Sarstedt (Deutschland, Nümbrecht)
Reagiergefäß 15 ml	CELLSTAR TUBES 15 ml	greiner bio-one (Deutschland, Frickenhausen)
Luminex	MAGPIX 4.2	Luminex Corporation (USA, Austin/Texas)
Gerätesoftware	Luminex xPONENT Version 4.2 Build 1324	
Statistik Programm	IBM SPSS Statistics 24	IBM (USA, Armonk)

### 4.2.2 Reagenzien und Kits

Tabelle 4.2 führt die für die Biomarkermessung verwendeten Kits und Reagenzien auf.

Tabelle 4.2: Für die Biomarkermessung verwendete Kits und Reagenzien

Name	Hersteller
Magnetic Luminex Assays Premixed Multiplex Lot-Nummer: 1447123	R&D SYSTEMS a biotechnie brand (USA, Minneapolis)
MAGPIX Performance Verification Kit MPX-PVER-K25	Luminex Corporation (USA, Austin / Texas)
Bleach 20 % Eau de Javel, Bleichmittel	Floreal Haagen GmbH (Deutschland, Wadgassen)
70 % ETOH	Carl Roth GmbH + Co. KG (Deutschland, Karlsruhe)
NaOH (0,1 NA)	
destilliertes Wasser (Dest.H <sub>2</sub> O)	Purelab Ultra ELGA (United Kingdom, High Wycombe)

### 4.3 Durchführung der Messung

Zur Durchführung der Biomarker-Messung werden die Magnetic-Luminex-Assays für die Biomarker ANGPTL4, GDF-15, Osteopontin und Rezeptor für AGE-Produkte (RAGE) von R&D Systems verwendet. Das Prinzip der Messung basiert auf der Bindung von spezifischen Antikörpern an die zu analysierenden Biomarker, welche mit farbcodierten magnetischen Micropartikeln markiert sind [71].

Die Proben werden auf 4 °C Temperatur gelagert und müssen zu Beginn der Messung auf Raumtemperatur erwärmt werden.

Anschließend wird eine Wash-Buffer-Lösung angesetzt, welche aus 480 ml destilliertem H<sub>2</sub>O besteht, zu denen 29 ml des Wash Buffer Concentrates des Kits gegeben werden. Vor jeder Messung werden für den Luminex MAGPIX Messstandards angesetzt, welche im Mess-Kit enthalten sind. Diese werden ebenfalls während jeder Messung bestimmt. Vier verschiedene Standards, die sich auf die vier zu analysierenden Biomarker der Messung beziehen, werden mit je 250 ml oder 200 ml Calibrator Diluent des Kits angesetzt. Nach der Zugabe werden die einzelnen Standards ausführlich gevortext.

Während einer 15-minütigen Inkubationszeit der Standards wird in sechs gekennzeichneten Eppendorf-Gefäßen erneut Calibrator Diluent Lösung für die spätere Verdünnung vorgelegt. Während in das erste Gefäß eine Menge von 600 µl gefüllt wird, enthalten die Gefäße 2–6 nur 200 µl Calibrator Diluent. Ist die Inkubationszeit vorüber werden je 100 µl der einzelnen Standards in das erste Eppendorf-Gefäß gegeben, sodass hier das



Gesamtvolumen 1000 µl beträgt. Um die Verdünnungsreihe zu beginnen gibt man je 100 µl des vorherigen Gefäßes in das nächste. Nach jeder Verdünnung wird gevortext. Die zu messenden Proben werden nun in einem Inkubator circa 30 Minuten lang aufgetaut.

Die Microparticles des Kits werden in einem lichtundurchlässigen Gefäß mit 5 ml Diluent RD2-1 angesetzt und anschließend gevortext. Ähnlich wie die Microparticles wird auch der Biotin-Antibody-Cocktail mit 5 ml Diluent RD2-1 in einem ebenfalls lichtundurchlässigen Gefäß vorbereitet und gründlich gevortext.

Der Farbstoff der Messung, das Streptavidin, wird mit 5,35 µl der zuvor angesetzten Wash-Buffer Lösung verdünnt und gleichermaßen lichtgeschützt aufbewahrt. Die nun aufgetauten achtzig Proben werden auf ein Rack umgeschichtet, welches auf Eis gelagert wird.

Bevor die Messplatte angesetzt wird, werden die Serumproben in einer Verdünnungsplatte 1:1 verdünnt – das bedeutet 50 µl der Serumproben und 50 µl der Calibrator Diluent Lösung. Auf einer im Kit enthaltenen Versuchsplatte wird nun in alle für die Proben vorgesehenen Plätze 50 µl der zuvor verdünnten Serumproben gegeben. Dabei werden die Serumproben der Studie einzeln mit einer Pipette durch mehrmaliges Hochziehen in den Pipettenaufsatz gemischt und 50 µl je Probe in das dazugehörige Well pipettiert. Die bereits verwendeten Proben werden erneut auf Eis gestellt, wobei auf die Reihenfolge der Serumproben genauestens geachtet werden muss.

In die ersten Wells der Versuchsplatte werden der Blanc (50 µl Calibrator Diluent) und der Standard (ebenfalls 50 µl je Standard) pipettiert. Die Wells der Blanc und der Standards werden während einer Messung doppelt bestimmt, während die Wells der Proben lediglich einfach bestimmt werden. Zuletzt werden in jedes Well 50 µl der Beads pipettiert.

Eine Lichtschutzfolie wird nun auf die Platte aufgebracht und diese auf den Orbital-Shaker mit circa 600–750 rpm für zwei Stunden inkubiert.

Ist die Inkubationszeit vorüber, wird in einem dreigängigen Waschschrift die Platte gesäubert. Dazu wird die Platte von dem Inkubator genommen und für eine Minute auf die Magnetplatte gestellt, damit die Microparticles am Magneten binden können.

Daraufhin wird der Überstand abgekippt und in jedes Well 100 µl Washpuffer pipettiert. Erneut kommt die Platte für eine Minute auf den Orbital-Shaker. Dieser Vorgang wird nun noch zweimal wiederholt.

Als nächstes werden die Antikörper auf die Platte gegeben. Diesbezüglich werden je 50 µl der Antibody-Lösung aus der lichtundurchlässigen Flasche pipettiert. Erneut wird die Platte abgeklebt und für eine Stunde zur Inkubation auf den Orbital-Shaker gestellt. Nach der Inkubationszeit werden die drei oben genannten Waschschrift wiederholt. Der

nächste Schritt beinhaltet das Binden des Farbstoffes an die Microparticles. Das zuvor angesetzte Streptavidin-PE wird gevortext und anschließend 50 µl in jedes einzelne Well pipettiert. Eine erneute Inkubationszeit auf dem Orbital-Shaker von 30 Minuten ist abzuwarten.

Erneut werden die drei Waschschritte nach der Inkubationszeit wiederholt. Damit der Luminex MAGPIX die nun vollständig vorbereitete Platte messen kann, wird jedes Well mit 100 µl Wash-Buffer angesetzt und für zwei Minuten auf dem Shaker vermengt.

Anschließend kann die Platte in den Luminex MAGPIX gegeben und gemessen werden. Während der Inkubationszeiten wurde der Luminex für die Messung vorbereitet. Hierzu ist die Reinigung des Messsystems von großer Bedeutung. In dem System wird über den Programmpunkt *Maintenance* die Reinigung *Revive After Storage* (Luminex) eingestellt. Die dazu benötigten Flüssigkeiten werden in hierfür vorgesehenen Kanister gefüllt (NaOH, ddH<sub>2</sub>O und Ethanol 70 %).

Ist die Reinigung beendet, wird der Computer für die folgende Messung eingestellt. Der Programmbereich *Batches* ist hierfür vorgesehen. Da die Kalibrierungen für die Messungen bereits stattgefunden haben, wird der Button *Create New Batch From Existing Protocol* gewählt. Gemessen wurden die Biomarker ANGPTL4, Osteopontin, GDF-15 und der RAGE-Faktor.

Um die Messung zu starten müssen weitere Kit-Details eingegeben werden:

Name: R&D

Kit Lot Nummer: z.B. 1447123

Expiry Date: 25th April 2017

Manufacturer: JC

Und die Referenzwerte der einzelnen Biomarker:

ANGPTL4: 360 810 pg/ml

Osteopontin: 636 310 pg/ml

GDF-15: 8320 pg/ml

RAGE: 52 380 pg/ml

In unserer Messung wird jede Probe lediglich einfach gemessen, weshalb der Replicate Count 1 eingestellt werden muss. Als letzter Schritt werden die zu messenden Batches mit den Patienten-ID's beschriftet.

Nach der Messung wird abschließend über den Programmbereich „Maintenance“ eine „Prepare for Storage“ Reinigung durchgeführt. Der Kanister muss mit Bleach-Lösung, ddH<sub>2</sub>O und NaOH neu befüllt werden.

## 4.4 Datenauswertung

Zur statistischen Auswertung der Messergebnisse wurde das Programm IBM SPSS Statistics 24.0.0.2 (SPSS Inc.; Chicago, Illinois) verwendet. Zusätzlich wurden Tabellen und Diagramme mit Microsoft Excel erstellt.

Für alle Zielgrößen wurden die Messergebnisse der Biomarker zunächst explorativ untersucht und deskriptiv ausgewertet, das heißt statistische Maßzahlen wie Median, Mittelwert, Standard Deviation (SD) und Interquartilsabstand (IQR) bestimmt. Diese konnten mit Hilfe von Boxplots und Histogrammen für die einzelnen Biomarker veranschaulicht werden.

Anschließend wurde eine multiple Regressionsanalyse durchgeführt, welche zeigt, in wie weit die untersuchten Variablen als unabhängige Prädiktoren signifikanten Einfluss auf die Biomarker haben.

Die Störfaktoren in der durchgeführten linearen Regression wurden vorher in einer univariablen Regressionsanalyse und mit Hilfe von in der Literatur anerkannten Störfaktoren, erkannt.

Für die Interpretation der Ergebnisse wurde der p-Wert und das 95 % korrespondierende Konfidenzintervall (KI) berechnet.

Das statistische Signifikanzniveau wurde als zweiseitiges Alpha von  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Um den Zusammenhang zwischen dem AATM und der Höhe der ANGPTL4 Konzentration festzulegen, verwendeten wir den Mann-Whitney-U-Test, da es sich um zwei unabhängige Stichproben handelte.



# 5 Ergebnisse

## 5.1 Die demographischen Ergebnisse des Patientenkollektivs

Die Biomarker wurden in 2741 Patientenproben gemessen. Das Kollektiv war während der Baseline Untersuchung (V1) im Mittel  $65 \pm 8,6$  Jahre alt und besaß einen BMI von  $27 \pm 5 \text{ kg/m}^2$ . Davon waren 1619 männlich (59,1 %) und 1122 (40,9 %) weiblich.

Zur Baseline der Untersuchung (V1) hatten 2074 (75,7 %) in den letzten vier Wochen nicht geraucht. 666 (24,3 %) Patienten hatten eine positive Rauchanamnese der letzten vier Wochen. Zu einem Patienten wurden keine Angaben gemacht. Der Mittelwert der Packyears lag bei 47,89 PKY, das Minimum bei 0 PKY und das Maximum bei 270 PKY. Bezüglich des GOLD Stadiums wurden 76 Patienten (2,8 %) in die Gruppe „Keine COPD gemäß GOLD und keine Symptome“ eingeteilt. 354 Patienten (12,9 %) fielen in die Gruppe „Keine COPD gemäß GOLD aber Symptome“. Symptome waren hier definiert als entweder das Vorhandensein einer chronischen Bronchitis und/oder mindesten drei angegebenen Punkten in der Kategorie Husten im CAT-Score.

Tabelle 5.1: Häufigkeit GOLD Klassifikation ABCD

	Häufigkeit	Prozent	Gültige Prozente	Kumulierte Prozente
Gültig	459	16,7	16,7	16,7
A	184	6,7	6,7	23,5
B	672	24,5	24,5	48,0
C	104	3,8	3,8	51,8
D	1322	48,2	48,2	100,0
Gesamt	2741	100,0	100,0	

Wie in Tabelle 5.1 ersichtlich, besaßen 282 Patienten (10,3 %) eine nach GOLD klassifizierte COPD im Stadium GOLD 1. 1009 Patienten (36,9 %) befanden sich im Stadium GOLD 2. Bei 803 (29,3 %) wurde GOLD 3 diagnostiziert und bei 197 (7,2 %) GOLD 4.

Die Klassifizierung der COPD nach ABCD richtet sich nach Häufigkeit der Exazerbationen und der Symptomatik.

Ein Überblick über die demographischen Eckdaten der COSYCONET Studie findet sich in Tabelle 5.2 – die demographische Daten zu den Komorbiditäten sind in Tabelle 5.3 abgebildet.

Tabelle 5.2: deskriptive Statistik des Gesamtkollektivs

Variable	Mittelwert $\pm$ SD	Median	IQR
Alter	65,06 $\pm$ 8,6	66	12
Durchschn. Zigaretten pro Tag	17,7 $\pm$ 10,6	15	14
Alter des Rauchbeginns	17,36 $\pm$ 4,6	16	3
Packyears	47,89 $\pm$ 35,7	42	42,5
FEV1	1,66 $\pm$ 0,72	1,54	0,99
FEV1%Pred	2,7 $\pm$ 0,6	2,81	0,91
FEV1 Sollprozent	0,6 $\pm$ 0,004	0,58	0,32
Residualvolumen	3,78 $\pm$ 1,23	3,63	1,61
TLCO	4,73 $\pm$ 2,02	4,5	2,68
ITGV	4,66 $\pm$ 1,32	4,52	1,79
CRP	4,03 $\pm$ 7,48	2	4,4
paCO <sub>2</sub>	37,83 $\pm$ 4,98	37,4	5,7
paO <sub>2</sub>	67,49 $\pm$ 9,19	66,7	11,6
LDL	110,01 $\pm$ 56,49	117	61
HDL	55,55 $\pm$ 29,89	57	31
Triglyceride	129,87 $\pm$ 101,1	106	89
Gesamt Cholesterin	186,36 $\pm$ 84,42	205	68
HbA1c	10,84 $\pm$ 12,69	5,9	0,9
BMI	27,03 $\pm$ 5,38	26,44	6,6
BODE-Index	2,25 $\pm$ 1,99	2	3
6 Min. Gehstrecke	419,31 $\pm$ 108,53	430	130
CAT-Score	18 $\pm$ 7,32	18	10,33
SGRQ	42,68 $\pm$ 19,98	41,67	29,35
ABI	1,18 $\pm$ 0,15	1,2	0,18
DemTec	15,26 $\pm$ 2,75	16	4

Tabelle 5.3: Demographie der Komorbiditäten

Komorbidität	Erkrankt	Nicht erkrankt
KHK	15,9 %	84,1 %
Herzinfarkt	8,2 %	91,8 %
Herzrhythmusstörungen	16,9 %	83,1 %
Herzinsuffizienz	10,1 %	89,9 %
Venenthrombosen	7,2 %	92,8 %
Schlaganfall	4,4 %	95,6 %
Fibrose	1,2 %	98,8 %
Sarkoidose	0,5 %	99,5 %

## 5.2 Messergebnisse der Biomarker

In Tabelle 5.4 zeigen sich Mittelwerte und SD, sowie der Median und der IQR der gemessenen Biomarker. Durch die Verteilung der Biomarker im Histogramm, beziehungsweise im Boxplot, sowie durch den Vergleich des Mittelwertes und des Medians kann bei keinem der drei Biomarker von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Tabelle 5.4: deskriptive Statistik der Biomarker

Biomarker	Mittelwert $\pm$ SD	Median	IQR
ANGPTL4	58219,74 $\pm$ 28050,91	52753	30350,5
GDF-15	488,05 $\pm$ 297,97	415,06	242,53
NT-proBNP	304,18 $\pm$ 463,3	180,08	348,65

## 5.3 Ergebnisse der uni- und multivariablen Analyse der ANGPTL4 Konzentration

Im Boxplot (Abb. 5.1) des Biomarkers zeigen sich Ausreißer nach oben sowie ein Histogramm (Abb. 5.2) mit einer schief nach rechts abfallenden Verteilung. Daher kann nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Es ergab sich ein Median von 52 753 pg/ml. Der Interquartilsabstand betrug 30 350,5 pg/ml.

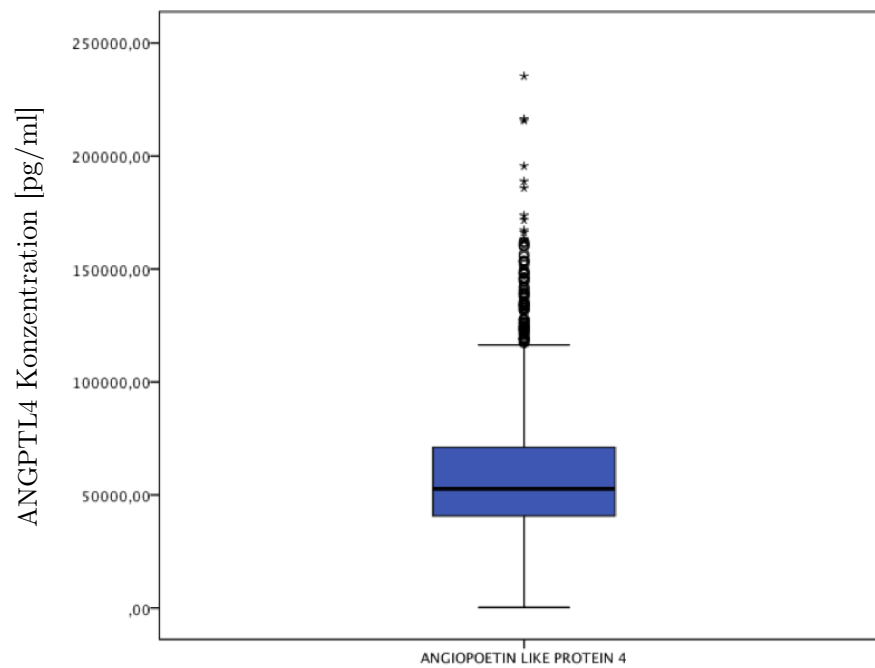


Abbildung 5.1: Verteilung des Biomarkers ANGPTL4 als Boxplot

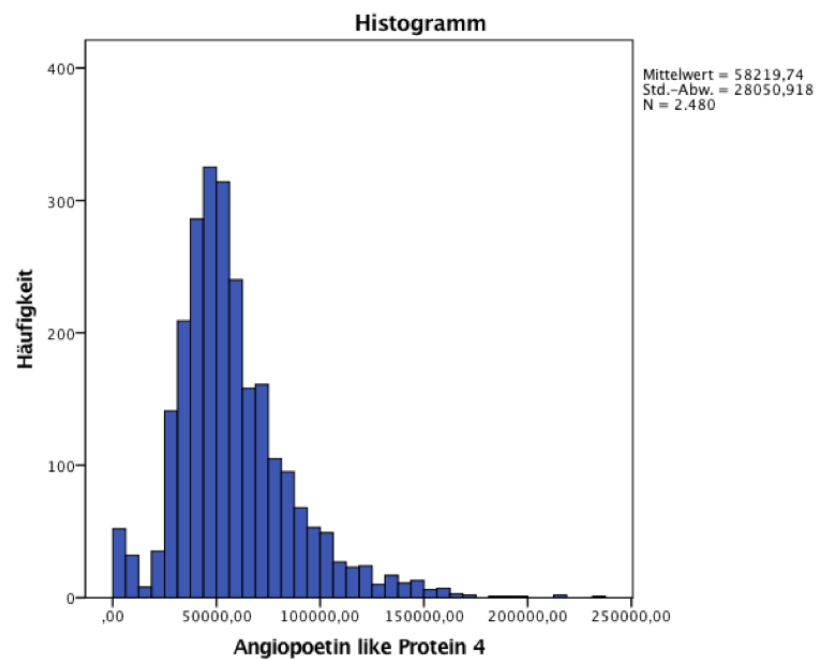


Abbildung 5.2: Verteilung des Biomarkers ANGPTL4 als Histogramm



In der linearen univariablen Regression und nach ausführlichen Literaturrecherchen wurden als Störfaktoren für die multivariable Analyse das biologische Alter, Geschlecht, BMI, das Alter des Rauchbeginns und der Cardiovascular Index (beinhaltet art. Hypertonie, KHK, Myokardinfarkte, Arrhythmien, Schlaganfälle) (CVI) festgelegt, da diese signifikanten Einfluss auf den Biomarker hatten. Diese wurden als Störfaktoren bei jeder multivariablen Analyse mit eingerechnet. Der CVI wurde jedoch bei Betrachtung der kardiovaskulären Komorbiditäten nicht als Störfaktor verwendet.

Sowohl in der uni- als auch multivariablen Analyse fanden sich signifikante p-Werte ( $p = 0,04$ ;  $\beta = 184$ ;  $KI = [81; 3605]$ ) bei der Analyse des sRAWeff.. Stieg die ANGPTL4-Konzentration, so stieg auch der sRAWeff..

Der sRAWeff wird mit Hilfe der Bodyplethysmographie bestimmt und durch das Verhältnis der Fläche der Atemschleife und der Fluss-Volumen-Kurve berechnet [22].

Der Atemwegswiderstand beschreibt die Druckdifferenz zwischen alveolärem Druck und Umgebungsdruck. Bei obstruktiven Erkrankungen – wie zum Beispiel der COPD – muss vermehrt alveolärer Druck aufgebracht werden, um eine bestimmte Strömung zu produzieren, der Atemwegswiderstand ist somit erhöht. Der spezifische Atemwegswiderstand zeigt die hierfür benötigte Atemarbeit auf, die aufgebracht werden muss, um ein bestimmtes Volumen einzuatmen. Er stellt einen wichtigen Parameter zur Beurteilung der Lungenfunktion dar [82].

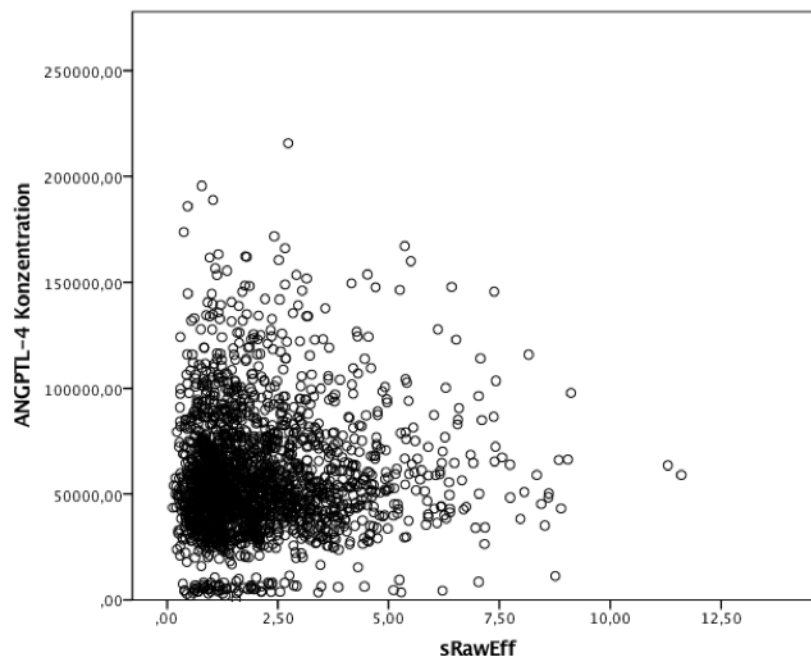


Abbildung 5.3: Korrelation der ANGPTL4 Konzentrationen und des sRAWeff.

Auch das RV zeigte in der multivariablen Analyse einen signifikanten p-Wert ( $p = 0,002$ ;  $\beta = 2893$ ;  $KI = [1027; 4758]$ ). Hier trat eine positive Korrelation auf.

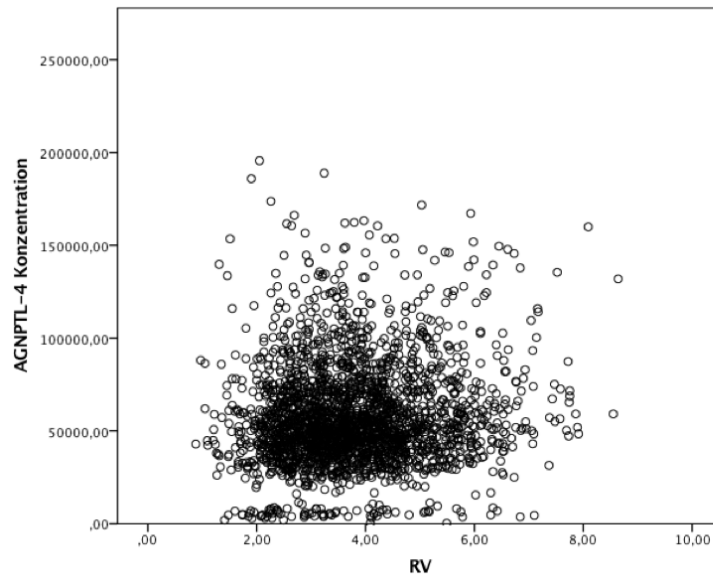


Abbildung 5.4: Korrelation der ANGPTL4 Konzentrationen und des Residualvolumens

Des Weiteren konnte eine signifikante Assoziation zwischen dem ITGV ( $p = 0,021$ ;  $\beta = 2260$ ;  $KI = [342; 4178]$ ) und der ANGPTL4 Konzentration ermittelt werden. Höhere ITGV korrelierten mit höheren ANGPTL4 Werten.

Als Entzündungsmarker hatte das CRP einen signifikanten Einfluss auf die Biomarker Konzentration ( $p = 0,015$ ;  $\beta = 271$ ;  $KI = [53; 489]$ ).

Auch die Lebensqualität der Patienten, die mithilfe des SGRQ erfragt wurde, zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit ANGPTL4 ( $p = 0,002$ ;  $\beta = 165$ ;  $KI = [63; 266]$ ). Ebenso zeigte der BODE-Index (BMI, Airflow Obstruction, Dyspnea and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease), ein Index in den der BMI, die FEV1, die subjektiv empfundene Luftnot und der SMWD einfließen, relevante p-Werte in der multivariablen Analyse ( $p = 0,024$ ). Der Regressionskoeffizient  $\beta = 1273$  deutet auf einen starken Einfluss der Variablen auf den Biomarker hin ( $KI = [164; 2382]$ ). Je schlechter der BMI, Airflow Obstruction, Dyspnea and Exercise Capacity Index in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (BODE-Index) war, desto höher war auch die Biomarker Konzentration.

Der SMWD, ein klinischer Funktionstest zur Bewertung der kardiovaskulären und pulmonalen Leistungsfähigkeit, korrelierte signifikant mit dem gemessenen Biomarkerwert ( $p = 0,024$ ;  $\beta = -25$ ;  $KI = [-46; -4]$ ). Der negative Korrelationskoeffizient zeigt, dass die zurückgelegte Gehstrecke sinkt, wenn die ANGPTL4 Konzentration steigt.

High Density Lipoprotein-Cholesterin (HDL) besaß einen signifikanten p-Wert ( $p = 0,047$ ;  $\beta = -77$ ;  $KI = [-153; -0,9]$ ) in der multivariablen Regressionsanalyse. Erhöhte ANGPTL4 Konzentrationen korrelierten mit niedrigeren HDL Serumkonzentrationen.

Das Low Density Lipoprotein Cholesterin (LDL), welches eine niedrigere Dichte als HDL besitzt und an der Entstehung von Arteriosklerose und der KHK beteiligt ist, besaß jedoch keine signifikante Relevanz.

Mit Hilfe eines Mann-Whitney-U Test konnten wir eine Signifikanz zwischen den beiden Gruppen AATM – ja oder nein – bestätigen. Mit einem  $p < 0,001$  ist der Zusammenhang hoch signifikant. Betrachtet man den gemittelten Rang beider Gruppen (Rangsumme dividiert durch die Gruppengröße), so erkennt man in beiden Gruppen (AATM – ja oder nein) eine unterschiedliche zentrale Tendenz (Abb. 5.5). Der mittlere Rang von Patienten ohne AATM beträgt 787,47. Der von den AATM-Patienten beträgt 972,6.

In welchem GOLD Stadium sich die Patienten befanden hatte keinen signifikanten Einfluss auf den gemessenen ANGPTL4 Wert (Abb. 5.6).

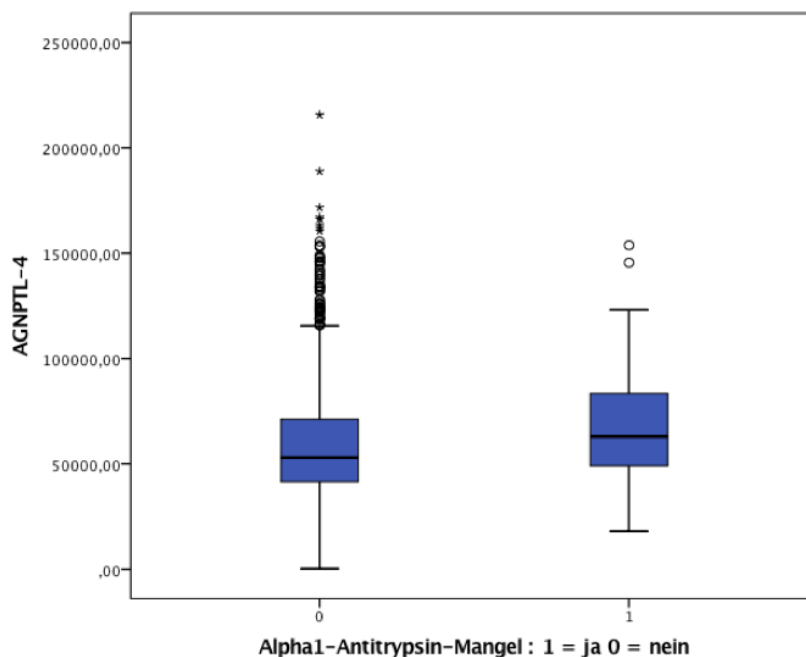


Abbildung 5.5: Boxplot AATM - ANGPTL4 Konzentration

In Tabelle 5.5 sind alle untersuchten Variablen der uni- und multivariablen Regression aufgelistet.

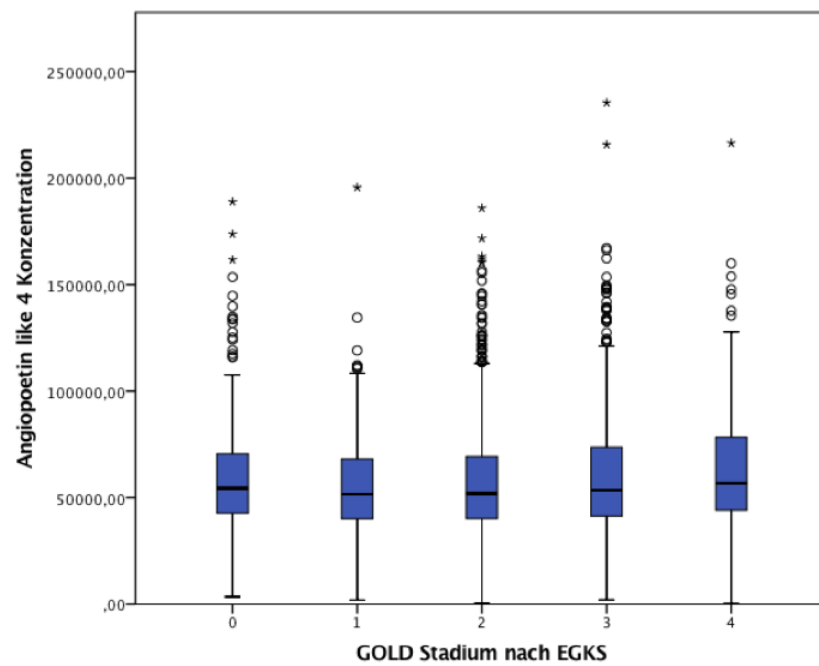


Abbildung 5.6: Boxplot GOLD Stadien nach EGKS und ANGPTL4 Konzentration

Tabelle 5.5: Uni- und multivariable Regression von ANGPTL4

**Confounder:** Alter, Alter des Rauchbeginns, BMI, CVI, Geschlecht

Variable	Univariable Analyse			Multivariable Analyse		
	Ref.	Sign.	$\beta$	Ref.	Sign.	$\beta$
GOLD 0	1631; 17080	0,018	9355	−7219; 25346	0,275	9063
A	−1503; 14142	0,113	6319	−9583; 23134	0,416	6775
B	324; 14913	0,041	7619	−7448; 24056	0,301	8303
C	2748; 17453	0,007	10100	−8521; 23551	0,082	7514
D	7054; 23414	0,000266	15234	12285; 48296	0,001	30291
FEV1	−2954; 103	0,068	−1425	−5182; 1078	0,199	−2051
sRAWtot	435; 1722	0,001	1079	−305; 2732	0,117	1213
sRAWeff	512; 2062	0,001	1287	81; 3605	0,04	1834
TLCO	761; 320	0,425	−220	−1854; 496	0,257	−678
RV	1248; 3075	0,000004	2161	1027; 4758	0,002	2893
TLC	541; 2026	0,001	1283	−549; 2892	0,182	1171
ITGV	917; 2614	0,000046	1765	342; 4178	0,021	2260
Exacerbation	−2117; 2496	0,872	189	−3851; 4914	0,812	531
CRP	239; 530	< 0,0001	384	53; 489	0,015	271
Leukos	199; 1123	0,005	661	−565; 1308	0,436	371
Bronchiekt.	−5699; 6657	0,879	479	−18784; 14568	0,804	−2107
Fibrose	3105; 23290	0,01	13198	−27776; 2217	0,826	−2799
Sarkoidose	−7282; 23330	0,304	8013	−86215; 1306	0,148	−36574
CA	−24301; 2495	0,979	327	−347940; 3238	0,877	−2777
Schlafapnoe	−3083; 3812	0,836	364	−2688; 11197	0,229	4254
Hypertonie	42; 4487	0,046	2264	−5853; 5298	0,922	−277
KHK	2179; 8212	0,001	5196	−7733; 7445	0,97	−143
Herzinfarkt	4106; 12232	0,000083	8169	−4020; 14550	0,266	5264
Herzinsuff.	−946; 8822	0,114	3938	−12253; 10938	0,911	−657
Herzrhythm.	307; 8197	0,035	4252	−15301; 4257	0,267	−5521
Schlaganfall	−4617; 6354	0,756	868	−18235; 3365	0,177	−7435
Venenthrom.	−305; 8408	0,068	4051	−2200; 13122	0,162	5460
Asthma	−3884; 1834	0,482	−1025	−4259; 7152	0,619	1446
Diabetes o.In	570; 8272	0,024	4421	−9036; 5904	0,681	−1566
Diabetes m.I	2365; 12256	0,004	7310	−4809; 16412	0,283	5801

Fortsetzung nächste Seite

Variable	Univariable Analyse			Multivariable Analyse		
	Ref.	Sign.	$\beta$	Ref.	Sign.	$\beta$
Chr.Bronch.	−306; 4266	0,09	1979	−2242; 6510	0,339	2133
Allergie	−5695; −1010	0,005	−3352	−2811; 5838	0,492	1513
SQRQ	114; 223	< 0,0001	169	63; 266	0,002	165
6MWD	−40; −19	< 0,0001	−30	−46; −4	0,017	−25
BODE	498; 1608	< 0,0001	1053	164; 2382	0,024	1273
ABI	−17408; 3057	0,005	−10233	−25467; 682	0,063	−12392
Cholesterol	−42; −16	< 0,0001	−29	−45; 4	0,108	−20
Triglyceride	−12; 9	0,812	−1	−24; 20	0,856	−2
LDL	−64; −25	< 0,0001	−45	−62; 11	0,172	−25
HDL	−116; −42	< 0,0001	−79	−153; −0,9	0,047	−77
HbA1c	−83; 106	0,812	11	−333; 27	0,097	−152
ohne Confounder CVI:						
Hypertonie				−3611; 4652	0,805	520
Herzinfarkt				−3058; 11922	0,246	4431
Herzrhythm.				−11311; 5608	0,508	−2851
KHK				−4803; 6583	0,759	889
Herzinsuff.				−10672; 11340	0,952	333

## 5.4 Ergebnisse der uni- und multivariablen Analyse der GDF-15 Konzentration

Auch im Boxplot (Abb. 5.7) der Verteilung des Biomarkers GDF-15 zeigen sich einige Ausreißer nach oben. Im Histogramm (Abb. 5.8) zeigt sich eine schief nach rechts auslaufende Verteilung. Aus diesen Gründen gehen wir nicht von einer Normalverteilung aus.

Es ergibt sich bei der GDF-15 Konzentrationen ein Median von 415,06 pg/ml. Der Interquartilsabstand betrug 242,53 pg/ml.

Die Spannweite der gemessenen Werte ergibt sich von dem kleinsten gemessenen Wert 11,05 pg/ml bis zum größten gemessenen Wert von 4070 pg/ml.

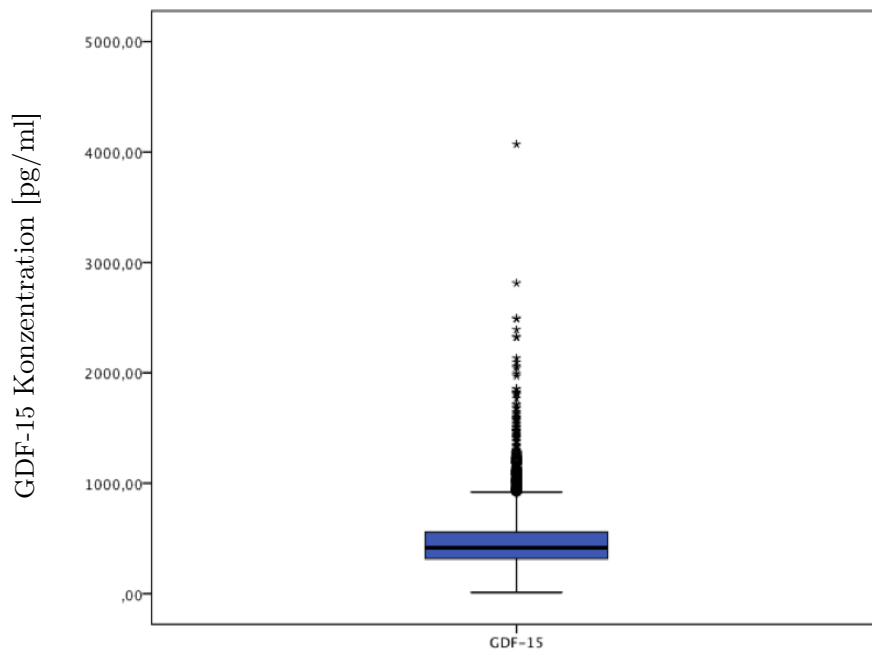


Abbildung 5.7: Boxplot GDF-15 Konzentration

Zwischen dem Patientenkollektiv, dass angegeben hat in den letzten vier Wochen aktiver Raucher gewesen zu sein, und denen, die abstinent waren, konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,618$ ) (siehe Abbildung 5.9).

Als Störfaktoren wurden durch eine univariable Regression und durch Literaturrecherchen das Alter der Patienten, das Geschlecht und der CVI für die multivariable Analyse festgelegt.

Ein signifikanter p-Wert ( $p < 0,001$ ;  $\beta = -11$ ;  $KI = [-18; -5]$ ) zeigte sich bei der

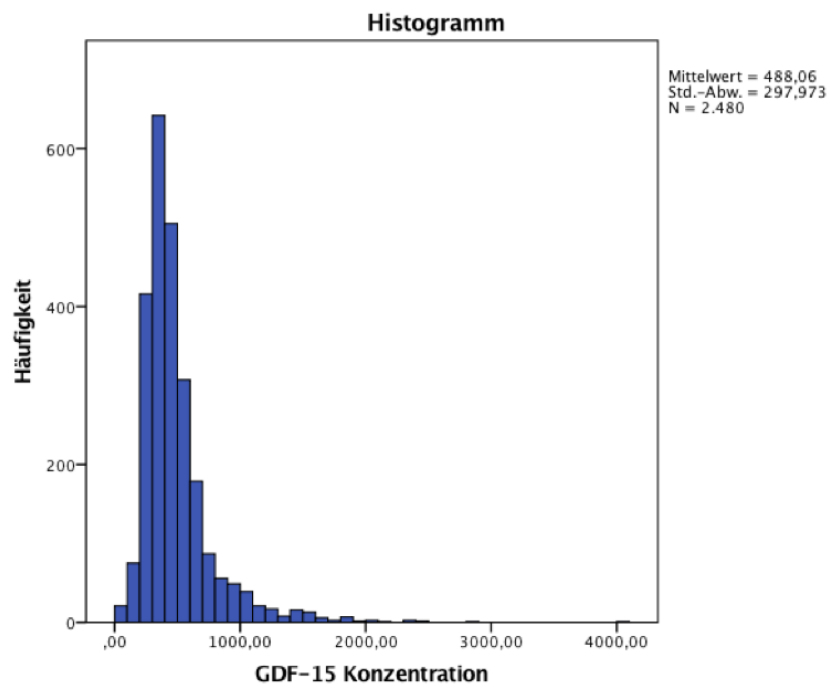


Abbildung 5.8: Histogramm der Verteilung der GDF-15 Konzentration

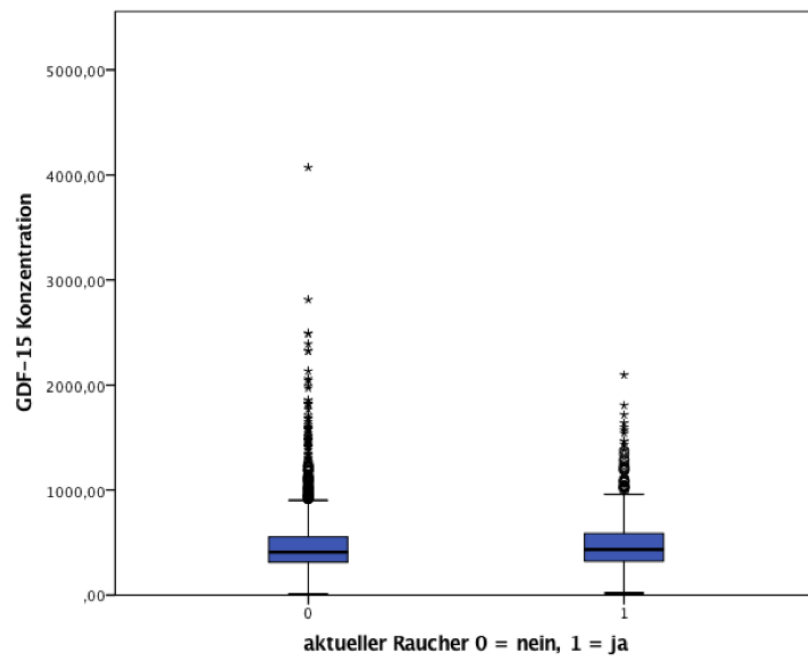


Abbildung 5.9: Boxplot GDF-15 und Raucherstatus



Variablen der Kohlenstoffmonoxid Diffusionskapazität (TLCO). Niedrigere TLCO Werte konnten mit erhöhten GDF-15 Konzentrationen assoziiert werden. Sie beschreibt die Diffusionskapazität der Lunge und ihre Fähigkeit Sauerstoff ( $O_2$ ) aus der Luft aufzunehmen und Kohlenstoffdioxid ( $CO_2$ ) abzugeben.

Der im Labor bestimmte CRP Wert zeigte sowohl in der uni-, als auch in der multivariablen Regression signifikante Korrelationen mit der GDF-15 Konzentration ( $p < 0,001$ ;  $\beta = 1,5$ ;  $KI = [0,04; 3]$ ). Erhöhte CRP Werte gingen mit erhöhten Biomarker Konzentrationen einher.

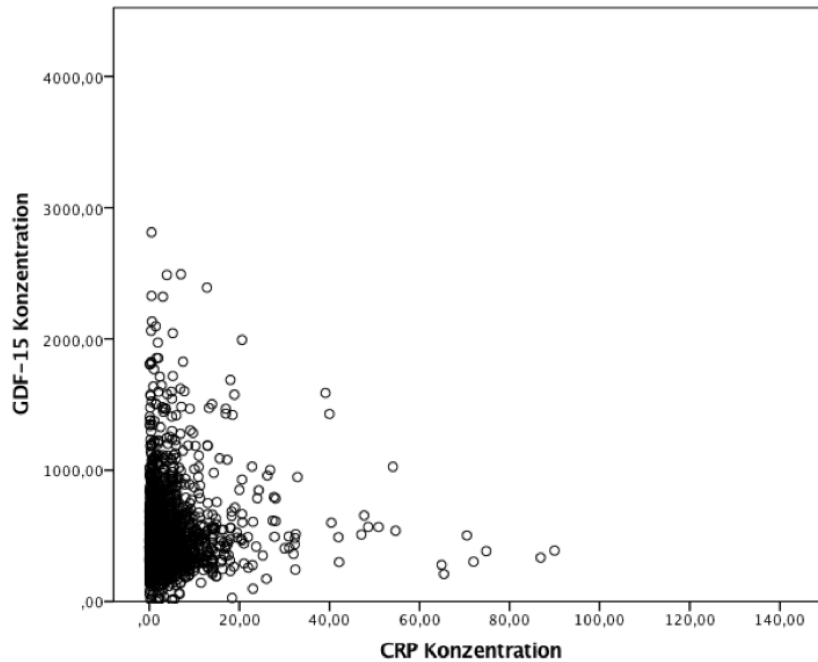


Abbildung 5.10: Verteilung der CRP Konzentration und GDF-15 Konzentration als Punktwolke

Die im Serum gemessene Triglycerid-Konzentration korrelierte negativ mit den GDF-15 Werten ( $p < 0,001$ ;  $\beta = 0,264$ ;  $KI = [0,15; 0,37]$ ).

GDF-15 zeigte einen Zusammenhang mit den Lungenerkrankungen Fibrose ( $p = 0,004$ ;  $\beta = 156,3$ ;  $KI = [50; 261]$ ) und Sarkoidose ( $p = 0,045$ ;  $\beta = 163,3$ ;  $KI = [3; 323]$ ). Kardiovaskulär korrelierten Komorbiditäten wie Herzinfarkt ( $p < 0,001$ ;  $\beta = 99,2$ ;  $KI = [56; 142]$ ), arterielle Hypertonie ( $p = 0,031$ ;  $\beta = 26,1$ ;  $KI = [2; 49]$ ) und Venenthrombosen ( $p = 0,02$ ;  $\beta = 54,3$ ;  $KI = [8; 100]$ ) signifikant mit der gemessenen GDF-15 Konzentration. Alle Komorbiditäten korrelierten positiv mit den Biomarker-Konzentrationen.

Da NT-proBNP in früheren Studien bereits mit der GDF-15 Konzentration assoziiert wurde, untersuchten wir auch diesen Zusammenhang. In der univariablen Analyse zeigte die NT-proBNP Konzentration eine deutliche Korrelation mit der Höhe des GDF-15 Spiegels ( $p = 0,002$ ;  $\beta = 0,042$ ;  $KI = [0,015; 0,068]$ ). Unter Berücksichtigung der Störfaktoren

Alter und Geschlecht blieb in der multivariablen Analyse der Zusammenhang signifikant ( $p = 0,041$ ;  $\beta = 0,028$ ;  $KI = [0,001; 0,054]$ ).

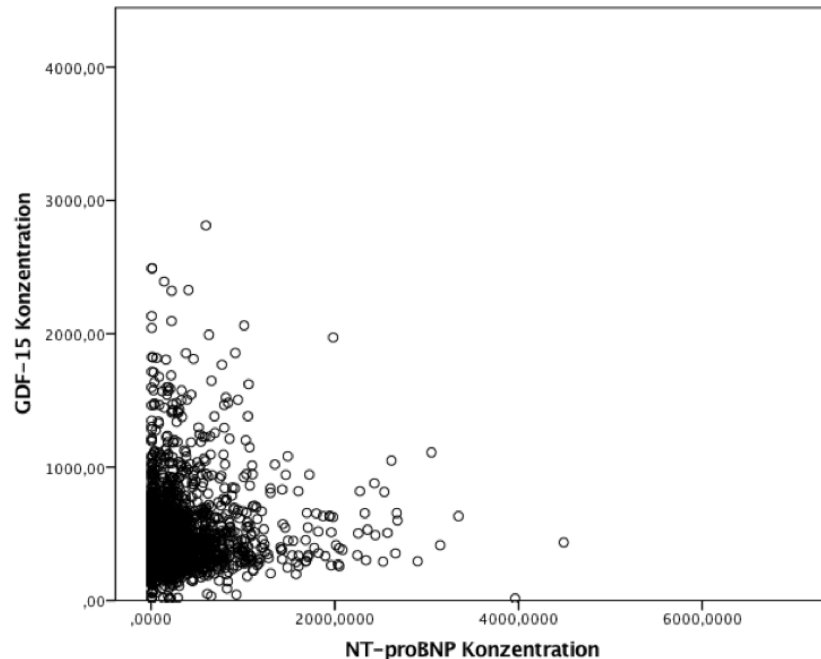


Abbildung 5.11: Verteilung der NT-proBNP und GDF-15 Konzentration

Verbunden mit der NT-proBNP Konzentration war in anderen Studien die Komorbidität Herzinsuffizienz bekannt. In unserer Studie konnte keine Signifikanz zu der Biomarkerkonzentration gezeigt werden ( $p = 0,915$ ;  $\beta = -2,6$ ;  $KI = [-50; 45]$ ).

Die Komorbidität Diabetes mellitus (ohne Insulin behandelt) besaß jedoch einen signifikanten p-Wert ( $p < 0,001$ ;  $\beta = 74,6$ ;  $KI = [33; 115]$ ).

Da es zu Kolinearitäten gekommen wäre, wurde bei den Variablen arterielle Hypertonie, Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz der Störfaktor CVI nicht berücksichtigt.

Auch bezüglich des SGRQ zeigte sich ein signifikanter p-Wert ( $p < 0,001$ ;  $\beta = 1,1$ ;  $KI = [0,6; 1]$ ). Der SMWD korrelierte ebenso mit dem gemessenen Biomarker ( $p < 0,001$ ;  $\beta = -0,2$ ;  $KI = [-0,3; -0,093]$ ).

Der ABI konnte einen signifikanten p-Wert aufweisen ( $p = 0,01$ ;  $\beta = -99,6$ ;  $KI = [-175; -23]$ ). Er dient zur kardiovaskulären Risikoabschätzung und zur Verlaufsbeurteilung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK).

Das GOLD Stadium (nach EGKS) der Patienten im Kollektiv hatte keinen signifikanten Einfluss auf die GDF-15 Konzentration – siehe Boxplot (Abb. 5.12).

In der nachfolgenden Tabelle 5.6 sind alle untersuchten Variablen der uni- und multivariablen Regression aufgeführt.

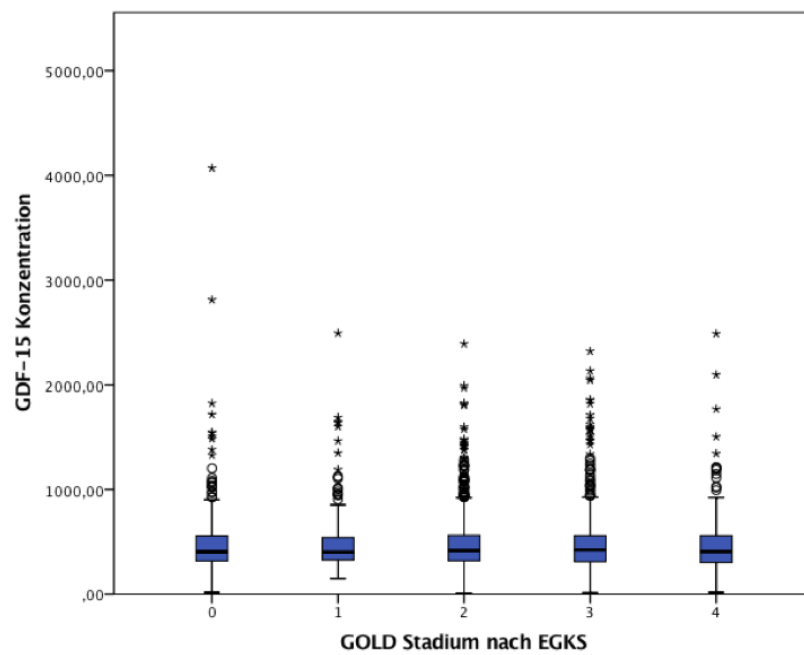


Abbildung 5.12: GOLD Stadien und GDF-15 Konzentration

Tabelle 5.6: Uni- und multivariable Regression von GDF-15

**Confounder:** Alter, Alter des Rauchbeginns, BMI, CVI, Geschlecht

Variable	Univariable Analyse			Multivariable Analyse		
	Ref.	Sign.	$\beta$	Ref.	Sign.	$\beta$
GOLD 0	−77; 87	0,907	4,9	−67; 95	0,735	14
A	−88; 78	0,905	−5	−92; 72	0,814	−9,8
B	−77; 77	1	0,012	−79; 74	0,945	−2,6
C	−73; 83	0,903	4,8	−73; 81	0,927	3,6
D	−78; 96	0,843	8,8	−67; 105	0,662	19,2
FEV1	−34; −1	0,029	−18	−32; −2	0,096	−14,7
sRAWtot	−4; 9	0,56	2	−6; 7	0,954	0,2
sRAWeff	−6; 10	0,679	1	−8; 8	0,97	−0,15
TLCO	−17; −5	< 0,0001	−11	−18; −5	< 0,0001	−11
RV	−2; 17	0,139	7,4	−8; 12	0,7	1,9
TLC	−7; 8	0,979	7	−14; 5	0,35	−4
ITGV	−2; 15	0,151	6	−5; 13	0,451	3,7
Exacerbation	−776; 392	0,519	−192	−639; 520	0,848	−56
CRP	0,2; 3	0,025	1,7	0,04; 3	0,044	1,5
Leukos	−0,6; 9	0,092	4	−0,6; 8	0,094	4,1
Bronchiekt.	−20; 110	0,18	44	−25; 104	0,23	39,5
Fibrose	52; 266	0,003	159	50; 261	0,004	156,3
Sarkoidose	−0,916; 323	0,051	161	3; 323	0,045	163,3
CA	−225; 297	0,786	36	−229; 285	0,829	28,3
Schlafapnoe	−18; 54	0,33	18	−31; 41	0,776	5,2
Hypertonie	21; 68	< 0,0001	45	−32; 31	0,994	−0,116
KHK	36; 100	< 0,0001	68	−32; 55	0,611	11,3
Herzinfarkt	81; 168	< 0,0001	125	34; 138	0,001	86,8
Herzinsuff.	−36; 59	0,651	11	−65; 37	0,587	−14,1
Herzrhythm.	−45; 31	0,725	−6	−93; −0,7	0,046	−47
Schlaganfall	9; 126	0,022	68	−40; 81	0,51	20,4
Venenthrom	17; 109	0,007	63	8; 100	0,02	54,3
Asthma	−37; 22	0,633	−7	−24; 36	0,69	6,1
Diabetes o.I	56; 138	< 0,0001	97	33; 115	< 0,0001	74,6
Diabetes m.I	18; 123	0,008	71	−12; 92	0,139	39,6

Fortsetzung nächste Seite

### 5.5 Signifikanzen in der uni- und multivariablen Analyse der NT-proBNP Konzentration

Variable	Univariable Analyse			Multivariable Analyse		
	Ref.	Sign.	$\beta$	Ref.	Sign.	$\beta$
Chr.Bronch.	−6; 41	0,159	17	−5; 42	0,139	18
Allergie	−36; 13	0,381	−11	−21; 28	0,792	3,3
SGRQ	0,7; 1	< 0,0001	1,3	0,6; 1	< 0,0001	1,1
6MWD	−0,4; −0,18	< 0,0001	−0,294	−0,3; −0,093	< 0,0001	−0,2
BODE	−1; 10	0,106	4	−1; 9	0,189	3,9
ABI	−220; −69	< 0,0001	−145	−175; −23	0,01	−99,6
Cholesterol	−0,2; 0,04	0,184	−0,093	−0,1; 0,08	0,42	−0,057
Triglyceride	0,175; 0,4	< 0,0001	0,289	0,15; 0,37	< 0,0001	0,264
LDL	−0,4; −0,023	0,029	−0,23	−0,3; 0,51	0,14	−0,155
HDL	−0,7; 0,008	0,055	−0,387	−0,707; 102	0,142	−0,303
HbA1c	0,02; 2	0,045	1	−0,1; 1	0,09	0,85
ohne Confounder CVI:						
Hypertonie				2; 49	0,031	26,1
Herzinfarkt				56; 142	< 0,0001	99,2
Herzrhythm.				9; 74	0,011	−17,9
KHK				−739; 5372	0,137	41,9
Herzinsuff.				−50; 45	0,915	−2,6

## 5.5 Signifikanzen in der uni- und multivariablen Analyse der NT-proBNP Konzentration

Es wurde bei 2741 Patienten die NT-proBNP-Konzentration im Serum gemessen. Die Konzentrationen von NT-proBNP zeigten im gesamten Kollektiv eine Spannweite von 4,8 pg/ml bis 7712,00 pg/ml mit einem Median von 180,08 pg/ml. Der IQR betrug 348,65 pg/ml.

Auch hier zeigen sich viele Ausreißer nach oben im Boxplot. Im Histogramm liegt eine schiefe Verteilung vor, sodass nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann.

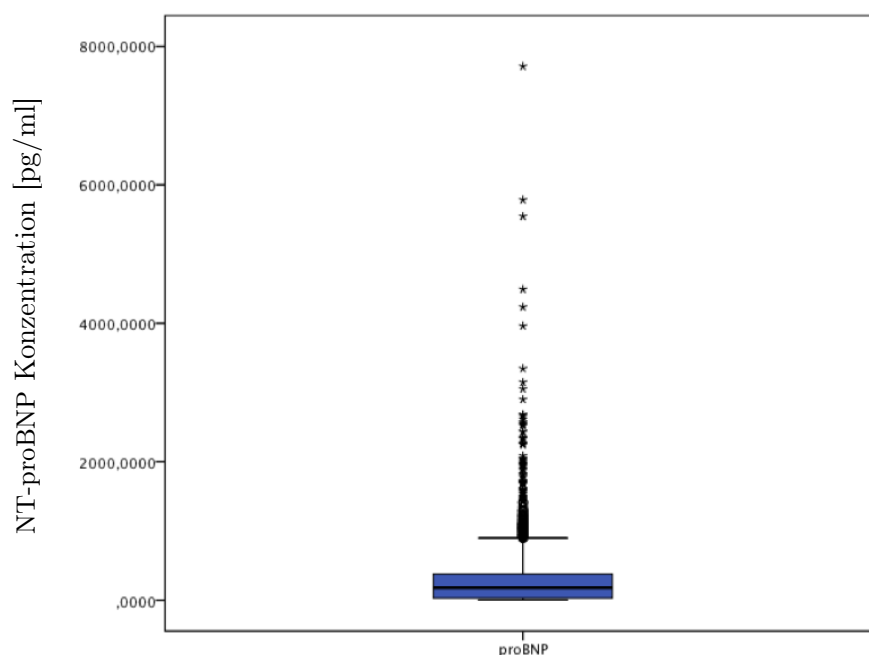


Abbildung 5.13: Boxplot NT-proBNP Konzentration

Bei NT-proBNP konnten als Störfaktoren für die multivariable Analyse der CVI, das Geschlecht, das biologische Alter, der BMI und das Alter des Rauchbeginns identifiziert werden.

Auch hier wurde der Störfaktor CVI bei der Regression der Variablen, arterielle Hypertonie, Herzinsuffizienz, Herzinfarkt, Herzrhythmusstörungen und der KHK ausgelassen, um Ko-Linearitäten zu vermeiden.

Obwohl in der univariablen Analyse die Anzahl der mittel- bis schwergradigen Exazerbationen in den letzten vier Wochen signifikant erscheint ( $p = 0,003$ ;  $\beta = -57,7$ ;  $KI = [-95; -20]$ ), konnte kein Zusammenhang in der multivariablen Analyse gezeigt wer-

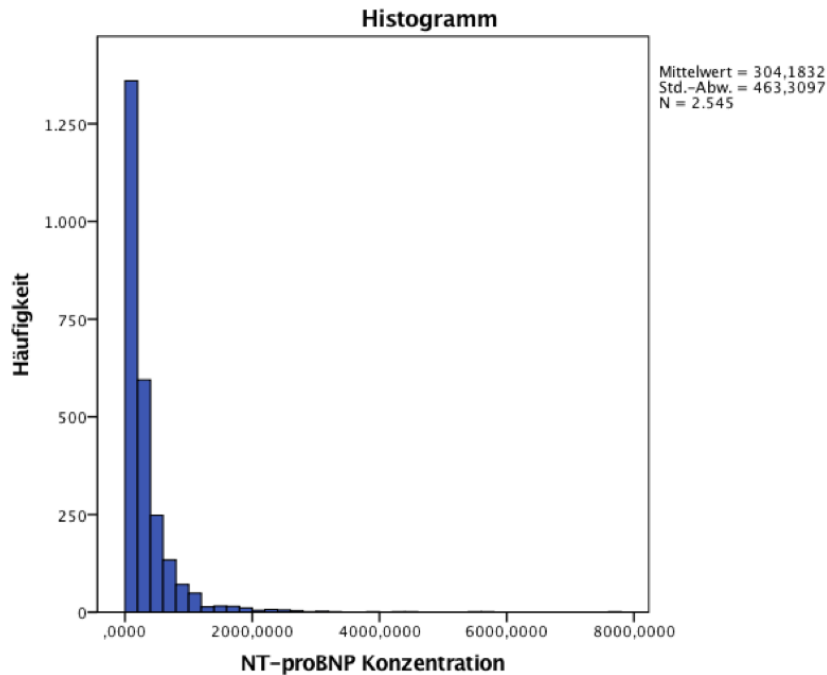


Abbildung 5.14: NT-proBNP Konzentration für das Gesamtkollektiv

den ( $p = 0,856$ ). Als signifikant erwies sich der Einfluss der KHK ( $p = 0,002$ ;  $\beta = 140,8$ ;  $KI = [51; 229]$ ) auf die Biomarkerkonzentration unter Berücksichtigung der Störfaktoren. Außerdem hatten anamnestisch bestätigte Schlaganfälle einen signifikanten Einfluss auf den Biomarker ( $p = -0,05$ ;  $\beta = -167,4$ ;  $KI = [-334; -0,09]$ ). Als bereits weit verbreiteter Marker für Herzinsuffizienz war die Korrelation von Marker und einer bestehenden Herzinsuffizienz wahrscheinlich.

Sowohl univariabel als auch multivariabel zeigten sich signifikante p-Werte und ein hoher Regressionskoeffizient ( $p = 0,028$ ;  $\beta = 182,9$ ;  $KI = [19; 346]$ ).

Ein statistischer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Biomarkers NT-proBNP und dem GOLD Stadium der Patienten konnte nicht gezeigt werden.

Auch keiner der gemessenen Lungenfunktionsparameter korrelierte mit der NT-proBNP Konzentration.

Die Lebensqualität (gemessen mit dem SGRQ) konnte anders als bei den anderen zwei Biomarkern nicht mit der NT-proBNP Konzentration in Verbindung gebracht werden. Außer den oben genannten kardiovaskulären Komorbiditäten (KHK, Schlaganfall Herzinsuffizienz) zeigte sich in der multivariablen Analyse keine weitere Komorbidität als signifikant.

Die anamnestisch erfragte Komorbidität eines Herzinfarkts zeigte sich in der univariablen Analyse als hoch signifikant ( $p < 0,001$ ;  $\beta = 145,8$ ;  $KI = [80; 211]$ ). In der multivariablen Analyse unter Berücksichtigung des Geschlechts, des biologischen Alters,

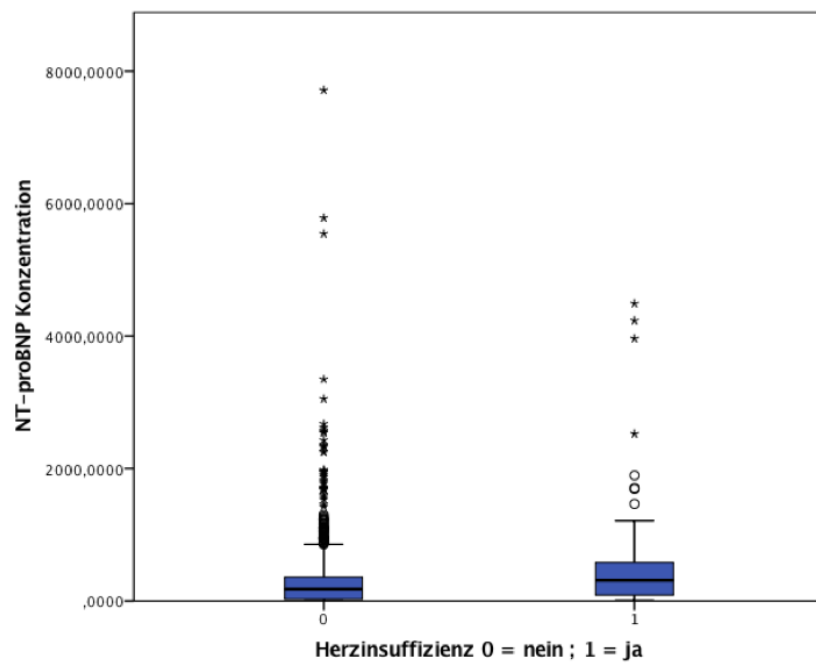


Abbildung 5.15: Boxplot NT-proBNP Konzentration bei Herzinsuffizienz

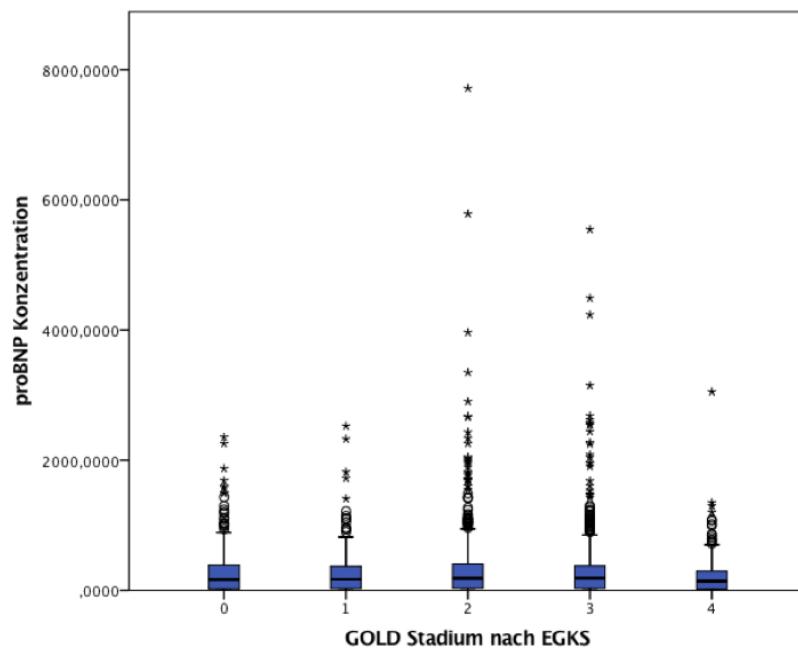


Abbildung 5.16: Boxplot GOLD Stadien der NT-proBNP Konzentration



### 5.5 Signifikanzen in der uni- und multivariablen Analyse der NT-proBNP Konzentration

BMIs und dem Alter des Rauchbeginns konnte jedoch keine Signifikanz mehr festgestellt werden ( $p = 0,066$ ;  $\beta = 110,1$ ;  $KI = [-7; 227]$ ).

Bezüglich der Lungenfunktion konnten wir keine signifikanten Zusammenhänge zwischen NT-proBNP Konzentration und einem Funktionsparameter der Lunge erkennen. Auch keiner der gemessenen Laborparameter (Hämoglobin A1c (HbA1c), HDL, LDL, Triglyceride, Cholesterol) korrelierte mit der Biomarkerkonzentration.

Tabelle 5.7: Uni- und multivariable Analyse von NT-proBNP

**Confounder:** Alter, Alter des Rauchbeginns, BMI, CVI, Geschlecht

Variable	Univariable Analyse			Multivariable Analyse		
	Ref.	Sign.	$\beta$	Ref.	Sign.	$\beta$
GOLD 0	-112; 135	0,853	11,6	-280; 298	0,951	9
A	-125; 127	0,984	1,2	-332; 248	0,777	-41,4
B	-62; 172	0,359	54,9	-267; 295	0,923	13,8
C	-71; 164	0,441	46,4	-255; 315	0,834	30,3
D	-168; 95	0,587	-36,6	-424; 204	0,493	-109,8
FEV1	-29; 20	0,743	-4,1	-71; 27	0,388	-21,7
sRAWtot.	-17; 2	0,159	-7,5	-27; 21	0,795	-3,1
sRAWeff.	-21; 3	0,148	-9,2	-32; 23	0,736	-4,7
TLCO	-16; 1	0,091	-7,8	-37; 2	0,08	-17,5
RV	-9; 19	0,512	4,9	-42; 17	0,408	-12,6
TLC	-6; 17	0,399	5,2	-52; 2	0,074	-24; 8
ITGV	-8; 19	0,423	5,6	-47; 14	0,293	-16,4
Exacerbation	-95; -20	0,003	-57,7	-175; 63	0,856	-6,4
CRP	-3; 1	0,343	-1,1	-5; 1	0,371	-1,5
Leukos	-11; 3	0,255	-4,3	-18; 10	0,575	-4,2
Bronchiekt.	-142; 56	0,394	-43,3	-301; 225	0,777	-38
Fibrose	-4; 313	0,057	154,6	-371; 338	0,926	-16,7
Sarkoidose	-221; 284	0,807	31,4	-612; 958	0,666	172,9
CA	-355; 458	0,804	51,3	-739; 371	0,515	-184,06
Schlafapnoe	-64; 47	0,763	-8,6	-177; 42	0,226	-67,6
Hypertonie	-26; 45	0,611	9,4	-144; 31	0,21	-56,4
KHK	51; 149	< 0,0001	100,6	27; 265	0,016	146,3
Herzinfarkt	80; 211	< 0,0001	145,8	-76; 213	0,353	68,4

Fortsetzung nächste Seite

Variable	Univariable Analyse			Multivariable Analyse		
	Ref.	Sign.	$\beta$	Ref.	Sign.	$\beta$
Herzinsuff.	93; 277	< 0,0001	185,8	32; 374	0,02	203,3
Herzrhythm.	25; 174	0,009	100	-71; 215	0,324	71,9
Schlaganfall	25; 202	0,012	114	-334; -0,09	0,05	-167,4
Venenthrom.	-76; 62	0,847	-6,8	-47; 194	0,234	73,5
Asthma	-125; -32	0,001	-78	-165; 15	0,102	-75,2
Diabetes o.In.	7; 132	0,028	70,2	-46; 187	0,239	70,2
Diabetes m.I.	-115; 45	0,391	-35,2	-231; 104	0,46	-63,3
Chron. Bronch.	-49; 25	0,536	-11,4	-61; 77	0,815	8,2
Allergie	-77; -0,7	0,046	-38,9	-39; 98	0,404	29,2
SGRQ	-1; 0,7	0,699	-0,179	-1; 1	0,768	-0,246
6MWD	-0,2; 0,053	0,178	-0,116	-0,59; 0,066	0,116	-0,264
BODE	-8; 10	0,789	1,2	-13; 22	0,608	4,69
ABI	-184; 39	0,203	-72	-264; 134	0,522	-65,2
Cholesterol	-0,3; -0,046	0,124	-0,169	-0,3; 0,3	0,98	-0,005
Triglyceride	-0,12; 0,23	0,523	0,058	-0,34; 0,37	0,916	0,02
LDL	-0,6; 0,02	0,069	-0,299	-0,5; 0,6	0,911	0,03
HDL	-0,9; 0,26	0,263	-0,348	-1; 1	0,811	-0,147
HbA1c	-0,617; 2	0,257	0,847	-2; 3	0,813	0,344
ohne Confounder CVI:						
Hypertonie				-53; 77	0,721	11,9
Herzinfarkt				-7; 227	0,066	110,1
Herzrhythm.				-67; 183	0,362	58
KHK				51; 229	0,002	140,8
Herzinsuff.				19; 346	0,028	182,9

## 6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob es sich bei ANGPTL4, GDF-15 oder bei NT-proBNP um einen diagnostischen, prognostischen oder einen Biomarker zur Stadien Einteilung der COPD handelt.

Durch ein großes Gesamtkollektiv (2741 Patienten) konnte eine Vielzahl an COPD Patienten mit ihren Komorbiditäten erfasst werden. Alle Untersuchungen orientierten sich an standardisierten Arbeitsanweisungen auf Basis etablierter Richtlinien, um äußere Einflussfaktoren auf die Datenerhebung möglichst gering zu halten.

### 6.1 Angiopoetin-like Protein 4

In der COSYCONET Studie fanden wir heraus, dass die ANGPTL4 Konzentration mit den Lungenfunktionsparametern des spezifischen effektiven Atemwegswiderstandes (sRAWeff.), dem Residualvolumen (RV) und dem Intrathorakalen Gasvolumen (ITGV) korreliert.

Alle drei zeigen einen positiven Korrelationskoeffizienten  $\beta$ . Steigt der ANGPTL4 Wert, so steigt das ITGV, das RV und der sRAWeff.. Sie werden mit Hilfe der Bodyplethysmographie bestimmt. Das intrathorakale Gasvolumen beschreibt das verbleibende Volumen im Thorax nach normaler Expiration – ist es erhöht, so spricht dies für eine Lungenüberblähung oder für ein Emphysem. Das Residualvolumen kann durch anatomische oder funktionelle Überblähung der Lunge (Air Trapping) erhöht sein. Der Atemwegswiderstand (Resistance) ist der empfindlichste Obstruktionsparameter bei Ruheatmung. Er ist bei obstruktiven Erkrankungen – wie der COPD – erhöht. Bezieht man dies auf die Korrelation des ANGPTL4 und den Lungenüberblähungsparametern – so könnten erhöhte ANGPTL4 Werte auf eine Überblähung der Lunge oder auf ein Emphysem hinweisen.

Es findet sich eine Korrelation zwischen dem Resistance Parameter (sRAWeff.) und der ANGPTL4 Konzentration, dadurch kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass somit ein Rückschluss auf die Stärke der Obstruktion gezogen werden kann.

Zwar stellt die Bodyplethysmographie eine objektive Messmethode des spezifischen Atemwegswiderstandes dar, es handelt sich jedoch um keinen Goldstandard zum Ab-

schätzen der Atemwegsobstruktion bei COPD Patienten. Bislang wurden in keiner Studie Lungenfunktionsparameter in Korrelation zu der ANGPTL4 Konzentration betrachtet. Unsere Hypothesen können demnach noch nicht mit anderen Ergebnissen verglichen werden.

Das C-reaktive Protein (CRP) – ein akute Phase Protein – ist im klinischen Alltag ein weit verbreiteter Marker für akute Entzündungsprozesse. In unserer Studie korreliert es mit der Höhe der ANGPTL4-Konzentration. In einer früheren Studie von Tjeerdema N. *et al.* konnte ANGPTL4 hypothetisch als Biomarker für Entzündungen angesehen werden, da es eine positive signifikante Korrelation zu CRP bei Diabetes Mellitus Typ 2 Patienten aufwies [91]. Auch bei den COPD Patienten könnte ANGPTL4 ein Parameter für akute Entzündungsprozesse darstellen.

Angiopoetine sind starke Induktoren der Angiogenese. Da die Angiogenese und Inflammation zwei eng verbundene Prozesse darstellen, wurde vor allem Angiopoetin-like Protein 2 (ANGPTL2) als Entzündungsmediator identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass ANGPTL2 bei multiplen chronisch-entzündlichen Erkrankungen hochreguliert wird. Auch die in mehreren Studien gemessene ANGPTL2 Konzentration bei Patienten mit einer Sepsis – einer systemischen Entzündungsreaktion – weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Familie der Angiopoetine und inflammatorischen Reaktionen hin [81]. Da ANGPTL4 zu derselben Familie wie ANGPTL2 gehört und eine ähnliche Struktur aufweist, ist es möglich, dass auch bei chronisch entzündlichen Prozessen der Lunge – zum Beispiel bei der COPD – die Konzentration der Angiopoetine in Korrelation mit Entzündungsparameter ansteigt.

Unseren Daten zufolge kann ANGPTL4 als Biomarker mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. CRP erweist sich im Alltag als sensitiver Marker für Infektionen und Entzündungen mit oder ohne klinische Manifestation. Hohe Konzentrationen können auch mit malignen Erkrankungen, chirurgischen Eingriffen, Traumata, Nierenfunktionsstörungen oder akuten Myokardinfarkten einhergehen. Zusätzlich wirken Immunprozesse modulierend auf die CRP Konzentration [26]. Wir berücksichtigten diese Störfaktoren in der Analyse des CRP Wertes nicht.

Je größer die Obstruktion ist, desto größer ist die Überblähung der Lunge, woraus eine erniedrigte Lebensqualität resultiert. Wir konnten zeigen, dass die ANGPTL4 Konzentration mit diesem wichtigen klinischen Endpunkt positiv korreliert. Je höher die ANGPTL4 Konzentrationen, desto eingeschränkter die gesundheitsbezogene Lebensqualität, erfasst mit Hilfe des SGRQ. Er ist ein krankheitsspezifischer Fragebogen zur Selbsteinschätzung der Lebensqualität von Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen.

Die Ursache der erniedrigten Lebensqualität bei erhöhten ANGPTL4 Werten ist uns jedoch unbekannt. Die wohl größte Lebensqualitätseinschränkung ergibt sich bei COPD

Patienten durch Exazerbationen. In einer Studie von Nikolakopoulou *et al.* [65] wurden bereits Serumkonzentrationssteigerungen von ANGPTL2 bei Exazerbationen gemessen. Bislang wurde der ANGPTL4 Wert während einer akuten exazerbierten COPD (AECOPD) nie betrachtet. Wir fanden jedoch keine Korrelation zwischen positiver Exazerbationsanamnese und der ANGPTL4 Konzentration.

Auch eine eingeschränkte Belastbarkeit der Patienten kann zu einer verminderten Lebensqualität führen. Stiegen die ANGPTL4 Werte unserer Probanden, so sank die 6-Minuten Gehstrecke (SMWD) signifikant ( $\beta = -25$ ). Da dieser Test zur Abschätzung der kardiovaskulären und pulmonalen Leistungsfähigkeit genutzt wird, kann man dies auf die ANGPTL4 Konzentration übertragen. Patienten mit einer erhöhten ANGPTL4 Konzentration zeigten eine niedrigere Leistungsfähigkeit.

Der BODE-Index korrelierte ebenfalls mit der ANGPTL4 Konzentration. Ein höherer Wert im BODE-Index (1 – 10) geht mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko von COPD Patienten einher. Höhere ANGPTL4 Werte korrelierten mit höheren Werten im BODE-Index.

De Torres *et al.* publizierten 2015 in einer Studie, dass der gemessene BODE-Index eine bessere prognostische Klassifikation darstellt als die GOLD Klassifikation [19]. Im klinischen Alltag gilt jedoch weiterhin die GOLD Klassifikation als Goldstandard. In wie weit die ANGPTL4 Konzentration mit dem Mortalitätsrisiko assoziiert werden kann, bleibt noch zu evaluieren.

ANGPTL4 inhibiert die Lipoproteinlipase, welche aus Chylomikronen und VLDL Triglyceride hydrolysiert. Erhöhte ANGPTL4 Werte sind mit Hypertriglyceridämien [87] und einem erhöhten Artherosklerose-Risiko assoziiert [48]. In unserer Analyse konnten wir zeigen, dass es eine signifikante negative Korrelation zwischen dem gemessenen ANGPTL4 Wert und dem im Serum gemessenen HDL Wert gibt. Sinkt der ANGPTL4 Spiegel, so steigt der HDL Spiegel. Erhöhte HDL-Cholesterin Werte führen zu einem erniedrigten Atheroskleroserisiko. Dies resultiert aus der Funktion des HDL-Cholesterins, Cholesterin aus Makrophagen der Arterienwand aufzunehmen und dieses an die Leber zur Ausscheidung zu liefern [14]. Eine inaktivierende Variante des ANGPTL4 Genes führte zu erhöhten HDL-Spiegeln und erniedrigten Triglyceriden, was mit erniedrigten kardiovaskulären Ereignissen assoziiert werden konnte [40, 23]. Im Hinblick auf die COPD spiegeln erhöhte ANGPTL4 Werte somit ein erhöhtes kardiovaskuläres Komorbiditäten-Risiko wider.

Angeichts der kleinen Regressionskoeffizienten bei den statistischen Analysen von CRP, SGRQ, SMWD und HDL ist von sehr kleinen Effekten auf die Biomarker Konzentration auszugehen.

Es konnte *in vitro* festgestellt werden, dass Alpha1-Antitrypsin die ANGPTL4 Sekretion zeit- und konzentrationsabhängig induziert [28]. Demnach führt ein Mangel an Alpha1-Antitrypsin zu einer erniedrigten Konzentration von ANGPTL4. Das kardiovaskuläre

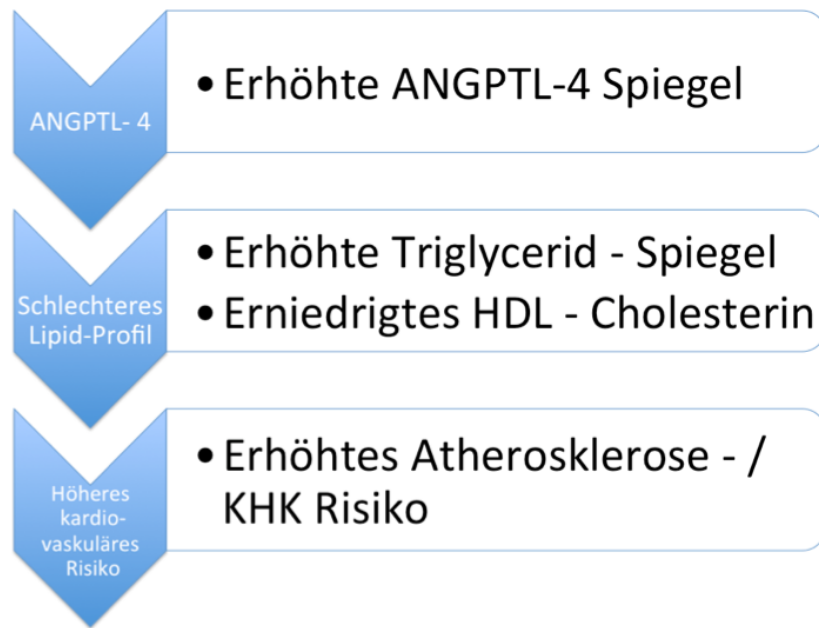


Abbildung 6.1: hypothetische Wirkung des ANGPTL4

Risikoprofil bei Patienten mit AATM ist folglich erniedrigt. Auch wir konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der ANGPTL4 Konzentration und dem Vorliegen eines AATM bestätigen.

Fähndrich *et al.* fanden anhand der COSYCONET Studie heraus, dass Patienten mit AATM ein geringeres kardiovaskuläres Risiko, im Vergleich zu COPD Patienten, die nicht an einem AATM erkrankt sind, aufweisen [29]. All unsere Ergebnisse bestätigen diesen Zusammenhang.

Als Schwachpunkt dieser Analyse ist jedoch zu nennen, dass lediglich 1601 von 2741 Probanden auf die Frage nach bestehenden AATM antworteten. 1140 Angaben fehlen demnach. Zusätzlich unterschieden wir zwar zwischen substituierten und nicht substituierten AATM Patienten, die Anzahl der Nichtsubstituierten war jedoch zu niedrig, um eine relevante statistische Aussage machen zu können.

## 6.2 Growth differentiation factor 15

Wir konnten zeigen, dass der Lungenfunktionsparameter TLCO signifikant negativ mit der GDF-15 Konzentration korreliert ( $\beta = -11$ ). Die TLCO weist auf die Fähigkeit der Lunge hin, wie viel Sauerstoff aus der Luft aufgenommen werden kann und wie viel Kohlenstoffdioxid abgegeben wird. Ist die TLCO vermindert, so weist dies auf eine Verdickung des Interstitiums (zum Beispiel durch eine Lungenfibrose), auf eine Rarefizierung

der Alveolen (z.B. durch ein Lungenemphysem) oder auf eine Einschränkung der Lungenstrombahn (z.B. durch Herzinsuffizienz oder Lungenembolien) hin [73]. Wir konnten zeigen, dass erhöhte GDF-15 Konzentrationen zu einer erniedrigten TLCO führen.

Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen auftretenden Lungenfibrosen oder Sarkoidosen und der Höhe der gemessenen GDF-15 Konzentration gezeigt werden.

Es ist bereits bekannt, dass transformierende Wachstumsfaktoren an der Pathogenese der systemischen Sklerose beteiligt sind. GDF-15 gehört zu dieser Familie der Wachstumsfaktoren. Gemessene GDF-15 Spiegel korrelierten stark mit den klinischen Symptomen und dem Einfluss auf die Lungenfunktion der Lungenfibrose. Während der Fibroseentwicklung wird die GDF-15 Produktion induziert und sie bedingt die daraus resultierende Lungenfunktionseinschränkung [53]. Diesen Zusammenhang konnten wir durch erhöhte GDF-15 Spiegel bei Fibrose- und Sarkoidose-Patienten bestätigen.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass in einem Kollektiv mit Patienten über 70 Jahren kardiovaskuläre Risikofaktoren (männliches Geschlecht, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, erhöhte Triglyceridspiegel, erniedrigte HDL-Cholesterin Spiegel, schlechte glomeruläre Filtrationsrate (GFR)) mit der GDF-15 Plasmakonzentrationen korrelieren [57]. Auch in der vorliegenden Studie korrelierte die GDF-15 Konzentration mit dem Auftreten kardiovaskulärer Komorbiditäten (Herzinfarkten, arterielle Hypertonie, Venenthrombosen und Diabetes mellitus (ohne Insulin behandelt)). Zwar war das Durchschnittsalter unseres Kollektiv geringer, im Mittel waren die Probanden 65 Jahre alt, dennoch scheint es eine Verbindung zwischen kardiovaskulären Komorbiditäten und der GDF-15 Plasmakonzentration zu geben.

Kempf *et al.* diagnostizierten die GDF-15 Konzentration als unabhängigen Prädiktor für das Outcome bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz, welche mit dem Alter der Patienten, der NYHA Klassifikation und der NT-proBNP Konzentration korrelierte [49]. GDF-15 Konzentrationen in der COSYCONET Studie korrelierten nicht ( $p = 0,915$ ) mit den Angaben der Patienten an einer Herzinsuffizienz zu leiden. Unter anderem kann dies an dem ausgewählten Kollektiv von COPD Patienten und der Tatsache liegen, dass Begleiterkrankungen lediglich anamnestisch erfragt wurden. Betrachtet man das gesamte Kollektiv so gaben lediglich 225 Probanden an (8,2 %), herzinsuffizient zu sein. Die Prävalenz der Herzinsuffizienz bei COPD Patienten liegt nach Ukena *et al.* über 20 % [96].

In unseren Analysen korrelierte jedoch die gemessene NT-proBNP Konzentration mit der Höhe des GDF-15 Wertes, was auf der anderen Seite stark für einen Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und GDF-15 Konzentration spricht und die von Kempf *et al.* [49] untersuchten Ergebnisse unterstützen würde.

In einer Studie mit 123 Patienten, bei denen eine Lungenembolie diagnostiziert wurde,

bestimmte man konsekutiv die GDF-15 Konzentration. Es stellte sich heraus, dass Patienten mit einem komplizierten Verlauf deutlich höhere GDF-15 Plasmakonzentrationen aufwiesen als solche, deren Embolie sich unkompliziert entwickelte [55].

Diese Ergebnisse weisen auf die mögliche Bedeutung von GDF-15 bei rechtsventrikulären Belastungsreaktionen hin und rücken den Biomarker ins Blickfeld der Erkrankungen des kardiovaskulären Systems und der pulmonalen Hypertonie. Unsere gemessenen, korrelierenden erhöhten NT-proBNP Werte könnten ebenfalls aus der rechtsventrikulären Drucküberlastung resultieren. Sekundäre pulmonale Hypertonie tritt gehäuft bei chronischen Lungenerkrankungen auf – bei COPD Patienten je nach Krankheitsstadium bei bis zu 50 % [17]. Als Ursache hierfür nimmt man an, dass die pulmonale Hypertonie durch das Remodelling der Lungenstrombahn mit Verdickung der Intima und Hypertrophie der glatten Muskelzellen entsteht [78, 67]. Es ist jedoch in unserer Studie nicht differenzierbar, inwiefern die erhöhten GDF-15 Werte in Verbindung mit einer möglichen Rechtsherzbelastung stehen, die aus einer möglichen pulmonalen Hypertonie entsteht oder ob der GDF-15 Anstieg durch die COPD als primäre Ursache resultiert.

Anamnestisch erfragte aufgetretene Herzinfarkte korrelierten positiv mit der GDF-15 Konzentration. Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass erhöhte zirkulierende Spiegel von GDF-15 unabhängige prognostische Marker bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI) sein können [106]. Auch wir können eine erhöhte Konzentration von GDF-15 nach akuten Koronarsyndromen bestätigen. Auch die Tatsache, dass der ABI – der zur Abschätzung des kardiovaskulären Risikos dient – mit der GDF-15 Konzentration unserer Population assoziiert werden kann, unterstreicht die Hypothese, dass GDF-15 eine wichtige Rolle in kardiovaskulären Pathogenesen spielt. Man nimmt an, dass GDF-15 bei kardiovaskulären Verletzungen sezerniert wird und über mehrere Kaskaden antiapoptotisch und somit kardioprotektiv wirkt [1]. Da wir nur einen Querschnitt beurteilen können, bleibt es ungeklärt, ob die Prognose der kardiovaskulären Komorbiditäten unserer Probanden mit der GDF-15 Konzentration assoziiert werden kann.

Des Weiteren korreliert die Höhe des CRP Wertes mit der GDF-15 Plasmakonzentration. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Patienten mit einer akuten exazerbierten COPD (AECOPD) erhöhte CRP und GDF-15 Spiegel aufweisen, im Vergleich zu nicht exazerbierten COPD Patienten und nicht erkrankten Kontrollpersonen [63]. Exazerbationen bei COPD Patienten sind wesentliche Ursachen für Mortalität und Morbidität bei der COPD [84]. Sie führen zu einer erniedrigten Lebensqualität und einem erhöhten Sterberisiko. Einen prädiktiven Marker für akute Exazerbationen zu finden würde im Alltag der COPD Patienten eine große Rolle spielen. Ärzte der *Copenhagen City Heart Study* und der *Copenhagen General Population Study* untersuchten, dass erhöhte CRP



Werte bei COPD Patienten zu einem erhöhten Risiko einer Exazerbation führen [90]. Es konnten deutliche Anstiege der GDF-15 Plasmakonzentration bei AECOPD gefunden werden [27].

Auch wenn es sich bei unseren Messungen um einen signifikanten Zusammenhang zwischen CRP-Werten und GDF-15 Konzentrationen handelt, so ist es schwierig, GDF-15 als eindeutigen Marker für den klinischen Alltag zu nennen, da der Regressionskoeffizient sehr niedrig ist ( $\beta = 1,5$ ). Auch in unserer Studie wurde der Einfluss der Nierenfunktion auf den CRP Wert nicht berücksichtigt [26].

Der SGRQ – also die Lebensqualität der COPD Patienten – korreliert ebenfalls mit der GDF-15 Konzentration. Die Ergebnisse des SMWD stehen im Zusammenhang mit der GDF-15 Konzentration. Diese zwei Korrelationen weisen darauf hin, dass die Höhe der GDF-15 Konzentration mit der alltäglichen Leistungsfähigkeit und Lebensqualität in Verbindung steht. Aktualisierte Klassifikationen orientieren sich immer mehr an der subjektiv empfundenen Lebensqualität der Patienten.

Obwohl GDF-15 einige Korrelationen aufweist sollte darauf hingewiesen werden, dass es sich um kein lungenspezifisches Zytokin handelt, der Sekretionsort der veränderten GDF-15 Konzentrationen kann in unserer Studie nicht identifiziert werden. Unter physiologischen Umständen wird es am höchsten in der Plazenta exprimiert, was die erhöhten zirkulierenden Spiegel während der Schwangerschaft erklärt. Aber auch andere Zelltypen, wie Myozyten, könnten unter Stressbedingungen vermehrt GDF-15 sezernieren [18]. Inwieweit die bei unseren Patienten gemessenen GDF-15 Werte auf kardiovaskuläre Komorbiditäten basieren, kann nicht differenziert werden.

Zusätzlich wurde von erhöhten Werten bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und verschiedenen Malignomen berichtet [92, 24]. 5,2 % unserer Probanden gaben an, an Diabetes mellitus zu leiden, der mit Insulin therapiert wird. 9 % bestätigten einen Diabetes mellitus, der ohne Insulin therapiert wird. Wir bezogen das Vorhandensein des Diabetes mellitus bei 14,2 % der Patienten nicht als Störfaktor in unsere Analyse mit ein. So können wir nicht sagen, ob erhöhte GDF-15 Konzentrationen durch die Komorbidität des Diabetes mitbedingt sind. In den multivariablen Regressionsanalysen zeigte sich ein Diabetes, der nicht mit Insulin behandelt wird auch als signifikant. Der behandelte Diabetes jedoch nicht.

Zwar ist der Prozentsatz der Probanden, der angab, an einem Karzinom erkrankt gewesen zu sein, klein (0,2 %), dennoch betrachteten wir auch diese Komorbidität nicht als Einflussfaktor.

Diagnostisch erweist sich GDF-15 als instabiler Biomarker. Durch die nicht vorhandene Korrelation mit den GOLD Stadien oder dem BODE-Index der Patienten kann es nicht zur Diagnosefindung oder zur Klassifizierung der Krankheit beitragen.

Dennoch konnten wir einen Zusammenhang mit kardiovaskulären Risikofaktoren bestätigen. Der Zusammenhang zwischen TLCO und GDF-15 hat das Potential, als möglicher Biomarker bei COPD-Patienten zu fungieren. Erhöhte GDF-15 Werte waren mit einer erniedrigten TLCO assoziiert. Mögliche Ursachen hierfür können Lungenfibrosen oder Lungenemphyseme sein.

Der Korrelation zwischen dem Auftreten eines Emphysems und erhöhten GDF-15 Konzentrationen ist fraglich, da keiner der Überblähungsparameter (ITGV, RV, totale Lungkapazität (TLC)) in unserer Studie mit der GDF-15 Konzentration korrelierte.

Das Auftreten einer Lungenfibrose konnte jedoch mit den GDF-15 Werten assoziiert werden.

### 6.3 N-terminales pro brain natriuretic peptide

Wir konnten herausfinden, dass erhöhte NT-proBNP Werte mit den Komorbiditäten Herzinsuffizienz, koronare Herzkrankheit und Schlaganfällen assoziiert sind.

Als bereits anerkannter und im klinischen Alltag etablierter Marker für Herzinsuffizienz war es zu erwarten, dass auch wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen Herzinsuffizienz und der Biomarker-Konzentration feststellen konnten. Patienten mit einer SD Erhöhung des proBNP Spiegels hatten ein um 27 % erhöhtes Mortalitätsrisiko und ein 28 % erhöhtes Risiko ein kardiovaskuläres Event zu erleiden [102].

Der hoch signifikante Zusammenhang zwischen KHK und NT-proBNP weist jedoch weiter darauf hin, dass kardiovaskuläre Erkrankungen eine wichtige Rolle bei COPD Patienten spielen. 436 Patienten gaben in unserer Kohorte an, an Durchblutungsstörungen am Herzen, Verengung der Herzkranzgefäße oder an Angina Pectoris zu leiden. Diese 15,9 % korrelierten positiv mit den gemessenen NT-proBNP Werten.

Frühere Studien haben gezeigt, dass erhöhte NT-proBNP Spiegel auf die rechtsventrikuläre Drucküberlastung zurückzuführen sind, die durch eine pulmonale Hypertension, pulmonale Thromboembolien oder chronische Lungenerkrankungen (zum Beispiel COPD) entsteht [64, 95, 7].

Es kann nicht differenziert werden, ob hier gemessene erhöhte NT-proBNP Spiegel durch eine Rechtsherzbelastung oder durch die COPD als primäre Ursache entstehen. Jedoch ist die COPD häufig mit einer pulmonalen Hypertension assoziiert [78, 67] und könnte so der Ursprung der erhöhten NT-proBNP Werte bei COPD Patienten sein.

Auf der anderen Seite sind erhöhte NT-proBNP Spiegel in einer anderen Studie von Lang *et al.* bei COPD Patienten gemessen worden. COPD Patienten zeigten erhöhte Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, bei denen niedrigere Werte gemessen werden

konnten [54].

In der Klinik gelten bei Männern zwischen 55 und 64 Jahren Werte von weniger als 210 pg/ml und zwischen 65 und 74 Jahren von weniger als 376 pg/ml als normwertig. Bei Frauen zwischen 55 und 64 Jahren sind die Normwerte geringer als 287 pg/ml und bei 65–74-jährigen unter 301 pg/ml [61, 4]. In unserem Kollektiv fanden wir einen Mittelwert von 304,18 pg/ml. Betrachtet man das Durchschnittsalter unseres Kollektivs – 65 Jahre – so erscheint der Mittelwert der NT-proBNP Konzentration auch in unserer Studie erhöht. Wir betrachteten jedoch nicht Männer und Frauen getrennt, oder die einzelnen Altersgruppen differenziert.

Bei Ghobadi *et al.* [34] korrelierte das GOLD Stadium, der SpO<sub>2</sub>-Wert und die Lebensqualität der Patienten (gemessen mit dem CAT-Score) positiv mit den pro-BNP Werten. Sie führten dies auf die, durch Hypoxie vermittelte, Kontraktion kleiner Lungenarteriolen und damit entstehende pulmonale Hypertension zurück. Man vermutet, dass dieser Mechanismus zu kardialen Stress und folgender pro-BNP Sekretion führt [85].

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Zunahme der sekundären pulmonalen Hypertonie und der BNP-Konzentration konnte von Ishii *et al.* bestätigt werden [44]. Sie schlugen NT-proBNP als prognostischen Marker für den Verlauf der COPD vor. Die Angaben dieser Studie bezogen sich jedoch nur auf die NT-proBNP Werte bei stabilen COPD Patienten.

Es ist jedoch anzumerken, dass die Erhöhung der NT-proBNP Werte bei COPD Patienten viel geringer als bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz ist. Klinisch relevante Zusammenhänge zwischen COPD Patienten und Zunahmen der Konzentrationen der NT-proBNP Werte zeigten sich bei Exazerbationen und durch die Notwendigkeit einer erhöhten intensivmedizinischen Betreuung [54].

Trotz der bereits gefundenen Korrelationen zwischen COPD und der NT-proBNP Konzentration konnten in der COSYCONET Studie keine Zusammenhänge zwischen NT-proBNP Konzentration und den Lungenfunktionsparametern, der GOLD Klassifikation, Laborparametern oder Komorbiditäten bei COPD Patienten festgestellt werden.

Schwächen der COSYCONET Studie können hier durch die Tatsache auftreten, dass wir zwar ein großes Kollektiv betrachteten, jedoch nur im Querschnitt. Eine Aussage dazu, ob NT-proBNP als Biomarker zur Verlaufskontrolle der COPD dient kann anhand dieser Arbeit nicht getroffen werden.

Zusätzlich ist zu nennen, dass viele der bereits gefundenen Zusammenhänge auf der Koexistenz von kardiovaskulären Begleiterkrankungen basieren. Die Tatsache, dass unter den untersuchten Variablen lediglich Herzinsuffizienz, KHK und Schlaganfälle mit der Höhe der Biomarker Konzentration korrelieren weist weiter darauf hin, dass diese Zusammenhänge durch die Existenz anderer kardiovaskulärer Komorbiditäten

auftreten. Auch wenn der CVI als Störfaktor in der Analyse berücksichtigt worden ist, fanden wir keine Zusammenhänge zwischen Lungenfunktionsparametern und der NT-proBNP Konzentration.

Die Serumspiegel von natriuretischen Peptiden sind bereits als wichtige Biomarker bei kardiovaskulären Erkrankungen etabliert. Immer mehr Aufmerksamkeit wird ihnen auch hinsichtlich pulmonaler Erkrankungen gewidmet. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Höhe der NT-proBNP Spiegel im Zusammenhang mit dem Krankheitsprozess verschiedener Lungenerkrankungen steht [76].

Die Daten der COSYCONET Studie zeigten keine Korrelation zwischen der NT-proBNP Konzentration und COPD definierenden Variablen, wie Lungenfunktionsparametern, BODE-Index, SGRQ Score oder der GOLD-Klassifikation. Vielmehr deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass eine Erhöhung der NT-proBNP Konzentration bei COPD Patienten auf der Existenz von kardiovaskulären Komorbiditäten basiert.

Diese Koexistenz der kardiovaskulären Erkrankungen bei COPD Patienten schränkt die Interpretation der NT-proBNP Konzentrationen stark ein.

Die COSYCONET Studie besitzt dennoch einige Einschränkungen, die bei Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

Komorbiditäten wurden durch Selbstauskunft der Patienten anhand einer vorgefertigten Liste und, soweit möglich, über die krankheitsspezifische Medikation identifiziert. Bei diesem Konzept kann es durch das Fehlen ärztlich diagnostizierter Komorbiditäten zu fehlerhaften Angaben kommen.

In dieser Arbeit betrachten wir die Baseline Untersuchung (V1) – also einen Querschnitt. Bezüglich der Biomarker Werte gibt es bislang keine weiteren Messungen der Blutproben der Folgeuntersuchungen (V2–V4). Alle Hypothesen zu Korrelationen zwischen Biomarker und Variablen beziehen sich also auf einen Querschnitt. In wie weit sich die Biomarker der einzelnen Individuen im Längsschnitt verändern, kann mit dieser Untersuchung nicht betrachtet werden.

Auch fehlen bei den Biomarkern korrespondierende Werte gesunder Probanden – wir besaßen keine Kontrollkohorte.

Alle Aussagen zu den Protein-Konzentrationen beziehen sich nur auf die Daten des COPD Kollektivs und ihrer Variabilität untereinander.

## 7 Abstract

Angiopoetin-like Protein 4 (ANGPTL4), Growth differentiation factor 15 (GDF-15) und N-terminales pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) als prognostische, diagnostische oder klassifizierende Biomarker bei COPD Patienten

**Hintergrund:** Bislang konnten keine verlässlichen diagnostischen oder prognostischen Biomarker im Zusammenhang mit der COPD identifiziert werden. ANGPTL4, GDF-15 und NT-proBNP sind vielversprechende Biomarker, die zum Teil bei Erkrankungen des kardiovaskulären Systems bereits etabliert sind.

**Hypothese:** Wir untersuchten die drei Biomarker, um sie auf ihre prognostisch, diagnostische und klassifizierende Aussagekraft bezüglich der COPD zu prüfen.

**Methoden:** Mit Hilfe der COSYCONET Studie konnte eine breite Kohorte mit 2741 Patienten untersucht werden. Durch standardisierte Protokolle auf Basis etablierter Richtlinien wurden Einflussfaktoren minimiert und vergleichbare Proben geschaffen. Allen Patienten wurden Serumblutproben entnommen, aus welchen mit Hilfe eines Immunoassays die Biomarker im Labor quantifiziert wurden. Danach erfolgte eine statistische Analyse unter Berücksichtigung individueller Störfaktoren jedes einzelnen Biomarkers.

**Ergebnisse:** Korrelationen konnten zwischen der ANGPTL4 Konzentration – unter Berücksichtigung der Störfaktoren Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index, Alter des Rauchbeginns und des kardiovaskulären Index – und spezifischen effektiven Atemwegswiderstand ( $p = 0,04$ ), Residualvolumen ( $p = 0,002$ ), intrathorakalem Gasvolumen ( $p = 0,021$ ), C-reaktives Protein ( $p = 0,015$ ), St.George's Respiratory Questionnaire ( $p = 0,002$ ), 6-Minuten Gehstrecke ( $p = 0,017$ ), BODE-Index ( $p = 0,024$ ) und HDL-Cholesterin ( $p = 0,047$ ) gefunden werden.

Bei GDF-15 wurden die Störfaktoren Alter, Geschlecht und kardiovaskulärem Index identifiziert. Es zeigten sich Zusammenhänge mit der Kohlenmonoxid-Diffusionskapazität ( $p < 0,001$ ) und den Komorbiditäten Fibrose ( $p = 0,004$ ), Sarkoidose ( $p = 0,045$ ), Herzinfarkten ( $p = 0,001$ ), arterielle Hypertonie ( $p = 0,031$ ), Venenthrombosen ( $p = 0,02$ )

und Diabetes mellitus ( $p < 0,001$ ). Zusätzlich korrelierte die GDF-15 Konzentration mit dem St.George's Respiratory Questionnaire ( $p < 0,001$ ), 6-Minuten Gehstrecke ( $p < 0,001$ ), Knöchel-Arm-Index ( $p = 0,01$ ) und den im Serum gemessenen Triglyceriden ( $p < 0,001$ ), sowie dem C-reaktiven Protein ( $p = 0,044$ ).

Die NT-proBNP-Konzentration zeigte keine Korrelation zu Lungenfunktionsparametern. Univariabel zeigte sich eine positive Exazerbationsanamnese als signifikant. Unter Berücksichtigung der Störfaktoren Geschlecht, Alter, Body-Mass-Index, kardiovaskulärem Index und dem Alter des Rauchbeginns verfiel diese Signifikanz jedoch. In der multivariablen Regressionsanalyse blieben die Komorbiditäten koronare Herzkrankheit ( $p = 0,016$ ), Schlaganfälle ( $p = 0,05$ ) und die Herzinsuffizienz ( $p = 0,002$ ) signifikant.

**Fazit:** Keiner der drei Biomarker eignet sich als diagnostischer oder klassifizierender Biomarker der COPD. Jedoch konnten die genannten Korrelationen darauf hinweisen, dass sie prognostische Eigenschaften besitzen.

So können erhöhte ANGPTL4 Konzentrationen auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko hinweisen. Sie können auch einen möglichen Biomarker für das Maß der Überblähung der Lunge darstellen. Zusätzlich können wir ANGPTL4 ebenfalls als Biomarker für akute Entzündungsprozesse vorschlagen.

GDF-15 kann prognostisch als Marker für Sarkoidosen und Lungenfibrosen dienen. Es ist kein lungenspezifisches Zytokin und die Werte korrelieren vermehrt mit kardiovaskulären Parametern als mit Lungenfunktionsparametern. Auch GDF-15 könnte ein Biomarker für Entzündungsprozesse darstellen.

NT-proBNP bleibt ein kardiovaskulärer Biomarker, der keine Korrelationen zu Lungenfunktion oder COPD Progress aufweist. Auch bezüglich Klassifikation, Lebensqualität oder Belastbarkeit fanden wir keine Zusammenhänge zur NT-proBNP Konzentration.

Wie zu erwarten war zeigten sich jedoch signifikante Zusammenhänge zu kardiovaskulären Komorbiditäten.

The role of Angiopoetin-like Protein 4 (ANGPTL4), Growth differentiation factor 15 (GDF-15) and N-terminales pro brain natriuretic peptide (NT-proBNP) as a biomarker in the chronic obstructive pulmonary disease.

**Background:** There are no reliable diagnostic and sparse prognostic laboratory parameters linked to chronic obstructive pulmonary disease. ANGPTL4, GDF-15 and NT-proBNP are promising biomarkers, which have been already identified for cardiovascular diseases.

**Hypothesis:** We tested the hypothesis that these three proteins are diagnostic, prognostic or severity biomarkers for patients with COPD.

**Methods:** The COSYCONET study includes a large cohort with 2741 patients. Standardized protocols based on established guidelines minimized influencing factors and created comparable samples. We took serum blood samples from all patients. In the laboratory we quantified the biomarkers using immunoassays. Afterwards we analyzed statistically the measured values regarding individual confounder for every biomarker.

**Results:** We could find correlations between Angiopoetin-like protein 4 and Specific Airway Resistance Effective. ( $p = 0.04$ ), Residual Volume ( $p = 0.002$ ), Intrathoracic Gas Volume ( $p = 0.021$ ), C-reactive Protein ( $p = 0.015$ ), St.George's Respiratory Questionnaire ( $p = 0.002$ ), Six-Minute Walking Distance ( $p = 0.017$ ), BODE-Index ( $p = 0.024$ ) and HDL-Cholesterol ( $p = 0.047$ ) – regarding the confounder age, gender, Body-Mass-Index, Packyears and cardiovascular Index.

Concerning GDF-15 we could identify the confounder age, gender and cardiovascular Index. There were significant associations between GDF-15 and diffusing capacity for carbon monoxide ( $p < 0.001$ ) and the comorbidities fibrosis ( $p = 0.004$ ), sarcoidosis ( $p = 0.045$ ), myocardial infarction ( $p = 0.001$ ), arterial hypertension ( $p = 0.031$ ), vein thrombosis ( $p = 0.02$ ) and diabetes mellitus ( $p < 0.001$ ). Additionally, the GDF-15 concentration correlated with St.George's Respiratory Questionnaire ( $p < 0.001$ ), Six-Minute Walking Distance ( $p < 0.001$ ), Ankle-Brachial-Index ( $p = 0.01$ ), and serum triglycerides ( $p < 0.001$ ), as well as C-Reactive Protein concentration ( $p = 0.044$ ).

The NT-proBNP concentration showed no correlation to pulmonary function parameters. In univariable analysis we found a significant correlation with a positive exacerbation history. Considering the confounder gender, age, Body-Mass-Index, Cardiovascular Index and Packyears this significance was removed. In multivariable analysis the comorbidities Coronary Heart Disease ( $p = 0.016$ ), strokes ( $p = 0.05$ ) and heart failure ( $p = 0.002$ )

remained significant.

**Conclusion:** None of the three biomarkers is suitable for diagnostic or classifying use in the clinical daily routine with COPD patients. Nevertheless, the identified correlations could stand for prognostic characteristics.

Thus, increased ANGPTL4 concentrations indicate an increased cardiovascular risk. It could also be used as a potential biomarker for the level of hyperinflation of the lung. In addition, we can also suggest ANGPTL4 as a biomarker for acute inflammatory processes. We can support the well-known assumption that the GDF-15 concentration correlates with the appearance of sarcoidosis and pulmonary fibrosis. GDF-15 is not a lung-specific cytokine and that is why increased values correlate more strongly with cardiovascular parameters than with pulmonary function parameters. GDF-15 could also be used as a biomarker of inflammatory processes.

NT-proBNP remains a cardiovascular biomarker that has no correlation to pulmonary function or COPD progression in our study. Regarding classification, quality of life or resilience, we found no relation to the NT-proBNP concentration. As expected, there were significant correlations with cardiovascular comorbidities.



# Literaturverzeichnis

- [1] Adela, R. and Banerjee, S. K. (2015). GDF-15 as a target and biomarker for diabetes and cardiovascular diseases: A translational prospective. *Journal of Diabetes Research*, 2015:1–14.
- [2] Adrish, M., Nannaka, V., Cano, E., Bajantri, B., and Diaz-Fuentes, G. (2017). Significance of NT-pro-BNP in acute exacerbation of COPD patients without underlying left ventricular dysfunction. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, Volume 12:1183–1189.
- [3] Agustí, A., Noguera, A., Sauleda, J., Sala, E., Pons, J., and Busquets, X. (2003). Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal*, 21(2):347–360.
- [4] Ansorge, L. S. (2). Referenzbereiche nt-probnp. <http://www.schenk-ansorge.de/labor/content/70/nt-probnp-herzinsuffizienz>.
- [5] Arand, M. (2017). Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (COPD): Klassifikation geändert. *Deutsches Aerzteblatt Online*.
- [6] Bals, R. (2018). Pathophysiologie der COPD. Unveröffentlicht.
- [7] Bando, M., Ishii, Y., Sugiyama, Y., and Kitamura, S. (1999). Elevated plasma brain natriuretic peptide levels in chronic respiratory failure with cor pulmonale. *Respiratory Medicine*, 93(7):507–514.
- [8] Barnes, P. J. (2004). Alveolar Macrophages as Orchestrators of COPD. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1(1):59–70.
- [9] Barnes, P. J. and Celli, B. R. (2009). Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *European Respiratory Journal*, 33(5):1165–1185.
- [10] Benowitz, N. L. (2014). Emerging nicotine delivery products. implications for public health. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(2):231–235.
- [11] Brown, D. A., Breit, S. N., Buring, J., Fairlie, W. D., Bauskin, A. R., Liu, T., and Ridker, P. M. (2002). Concentration in plasma of macrophage inhibitory cytokine-1 and risk of cardiovascular events in women: a nested case-control study. *The Lancet*, 359(9324):2159–2163.
- [12] Buchan, A., Bennett, R., Coad, A., Barnes, S., Russell, R., and Manuel, A. R. (2015). The role of cardiac biomarkers for predicting left ventricular dysfunction and cardiovascular mortality in acute exacerbations of COPD. *Open Heart*, 2(1):e000052.

- [13] Bundesministerium für Bildung und Forschung (2018). COSYCONET – Ein- und Ausschlusskriterien. <http://www.asconet.net/html/cosyconet/teilprojekt1/eakriterien?asconetsid=a29476c313dab028824930b750911916>. Aufgerufen am 03.03.2018.
- [14] Calabresi, L., Gomaraschi, M., Simonelli, S., Bernini, F., and Franceschini, G. (2015). HDL and atherosclerosis: Insights from inherited HDL disorders. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851(1):13–18.
- [15] Cargill, R. I. and Lipworth, B. J. (1996). Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cor pulmonale. *Chest*, 110(5):1220–1225.
- [16] Celli, B. R., Cote, C. G., Marin, J. M., Casanova, C., de Oca, M. M., Mendez, R. A., Plata, V. P., and Cabral, H. J. (2004). The body-mass index, airflow obstruction, dyspnea, and exercise capacity index in chronic obstructive pulmonary disease. *New England Journal of Medicine*, 350(10):1005–1012.
- [17] Chaouat, A., Naeije, R., and Weitzenblum, E. (2008). Pulmonary hypertension in COPD. *European Respiratory Journal*, 32(5):1371–1385.
- [18] Daniels, L. B., Clopton, P., Laughlin, G. A., Maisel, A. S., and Barrett-Connor, E. (2011). Growth-differentiation factor-15 is a robust, independent predictor of 11-year mortality risk in community-dwelling older adults. *Circulation*, 123(19):2101–2110.
- [19] de Torres, J. P., Casanova, C., Marín, J. M., Pinto-Plata, V., Divo, M., Zulueta, J. J., Berto, J., Zagaceta, J., Sanchez-Salcedo, P., Cabrera, C., Carrizo, S., Cote, C., and Celli, B. R. (2014). Prognostic evaluation of COPD patients: GOLD 2011 versus BODE and the COPD comorbidity index COTE. *Thorax*, 69(9):799–804.
- [20] de Torres, J. P., Wilson, D. O., Sanchez-Salcedo, P., Weissfeld, J. L., Berto, J., Campo, A., Alcaide, A. B., García-Granero, M., Celli, B. R., and Zulueta, J. J. (2015). Lung cancer in patients with chronic obstructive pulmonary disease. development and validation of the COPD lung cancer screening score. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 191(3):285–291.
- [21] Definitions Working Group, B. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3):89–95.
- [22] Dennis Bösch, C.-P. C. (2013). *Lungenfunktionsprüfung*. Springer-Verlag GmbH.
- [23] Dewey, F. E., Gusarova, V., O’Dushlaine, C., Gottesman, O., Trejos, J., Hunt, C., Hout, C. V. V., Habegger, L., Buckler, D., Lai, K.-M. V., Leader, J. B., Murray, M. F., Ritchie, M. D., Kirchner, H. L., Ledbetter, D. H., Penn, J., Lopez, A., Borecki, I. B., Overton, J. D., Reid, J. G., Carey, D. J., Murphy, A. J., Yancopoulos, G. D., Baras, A., Gromada, J., and Shuldiner, A. R. (2016). Inactivating variants in ANGPTL4 and risk of coronary artery disease. *New England Journal of Medicine*, 374(12):1123–1133.

- [24] Dominguez-Rodriguez, A., Abreu-Gonzalez, P., and Avanzas, P. (2014). Usefulness of growth differentiation factor-15 levels to predict diabetic cardiomyopathy in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*, 114(6):890–894.
- [25] Doyama, K., Fukumoto, M., Takemura, G., Tanaka, M., Oda, T., Hasegawa, K., Inada, T., Ohtani, S., Fujiwara, T., Itoh, H., Nakao, K., Sasayama, S., and Fujiwara, H. (1998). Expression and distribution of brain natriuretic peptide in human right atria. *Journal of the American College of Cardiology*, 32(7):1832–1838.
- [26] Fichtlscherer, S., Rosenberger, G., Walter, D. H., Breuer, S., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (2000). Elevated c-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 102:1000–1006.
- [27] Freeman, C. M., Martinez, C. H., Todt, J. C., Martinez, F. J., Han, M. K., Thompson, D. L., McCloskey, L., and Curtis, J. L. (2015). Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease are associated with decreased CD4+ & CD8+ T cells and increased growth & differentiation factor-15 (GDF-15) in peripheral blood. *Respiratory Research*, 16(1).
- [28] Frenzel, E., Wrenger, S., Immenschuh, S., Koczulla, R., Mahadeva, R., Deeg, H. J., Dinarello, C. A., Welte, T., Marcondes, A. M. Q., and Janciauskiene, S. (2014). Acute-phase protein 1-antitrypsin—a novel regulator of angiopoietin-like protein 4 transcription and secretion. *The Journal of Immunology*, 192(11):5354–5362.
- [29] Fährndrich, S., , Biertz, F., Karch, A., Kleibrink, B., Koch, A., Teschler, H., Welte, T., Kauczor, H.-U., Janciauskiene, S., Jörres, R. A., Greulich, T., Vogelmeier, C. F., and Bals, R. (2017). Cardiovascular risk in patients with alpha-1-antitrypsin deficiency. *Respiratory Research*, 18(1).
- [30] Gale, C. P., White, J. E., Hunter, A., Owen, J., Allen, J., Watson, J., Holbrook, I., Durham, N. P., and Pye, M. P. (2011). Predicting mortality and hospital admission in patients with COPD. *Journal of Cardiovascular Medicine*, 12(9):613–618.
- [31] Gan, W. Q., Man, S. F. P., Senthilselvan, A., and Sin, D. D. (2004). Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax*, 59:574–580.
- [32] Garcia-Arcos, I., Geraghty, P., Baumlin, N., Campos, M., Dabo, A. J., Jundi, B., Cummins, N., Eden, E., Grosche, A., Salathe, M., and Foronjy, R. (2016). Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax*, 71(12):1119–1129.
- [33] Gerritsen, W. B. M., Asin, J., Zanen, P., van den Bosch, J. M. M., and Haas, F. J. L. M. (2005). Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respiratory medicine*, 99:84–90.
- [34] Ghobadi, H., Aslani, M. R., Hosseinian, A., and Farzaneh, E. (2017). The correlation of serum brain natriuretic peptide and interleukin-6 with quality of life using the

- chronic obstructive pulmonary disease assessment test. *Medical Principles and Practice*, 26(6):509–515.
- [35] Grana, R., Benowitz, N., and Glantz, S. A. (2014). E-Cigarettes: a scientific review. *Circulation*, 129(19):1972–1986.
- [36] Guo, L., Li, S., Zhao, Y., Qian, P., Ji, F., Qian, L., Wu, X., and Qian, G. (2015). Silencing angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulating SIRT1 /NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Cellular Physiology*, 230(10):2390–2402.
- [37] Guo, L., Li, S.-Y., Ji, F.-Y., Zhao, Y.-F., Zhong, Y., Lv, X.-J., Wu, X.-L., and Qian, G.-S. (2013). Role of angptl4 in vascular permeability and inflammation. *Inflammation Research*, 63(1):13–22.
- [38] Hanania, N. A. and Sharafkhaneh, A., editors (2011). *COPD*. Respiratory Medicine. Humana Press.
- [39] Hato, T., Tabata, M., and Oike, Y. (2008). The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 18(1):6–14.
- [40] Helgadóttir, A., Gretarsdóttir, S., Thorleifsson, G., Hjartarson, E., Sigurdsson, A., Magnusdóttir, A., Jonasdóttir, A., Kristjánsson, H., Sulem, P., Oddsson, A., Sveinbjörnsson, G., Steinthorsdóttir, V., Rafnar, T., Masson, G., Jonsdóttir, I., Olafsson, I., Eyjolfsson, G. I., Sigurdardóttir, O., Daneshpour, M. S., Khalili, D., Azizi, F., Swinkels, D. W., Kiemeny, L., Quyyumi, A. A., Levey, A. I., Patel, R. S., Hayek, S. S., Gudmundsdóttir, I. J., Thorgeirsson, G., Thorsteinsdóttir, U., Gudbjartsson, D. F., Holm, H., and Stefánsson, K. (2016). Variants with large effects on blood lipids and the role of cholesterol and triglycerides in coronary disease. *Nature Genetics*, 48(6):634–639.
- [41] Hirschfield, G. and Pepys, M. (2003). C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM: An International Journal of Medicine*, 96(11):793–807.
- [42] Høiseth, A., Omland, T., Hagve, T.-A., Brekke, P. H., and Søyseth, V. (2012). NT-proBNP independently predicts long term mortality after acute exacerbation of COPD – a prospective cohort study. *Respiratory Research*, 13(1):97.
- [43] Inoue, T., Kohro, T., Tanaka, T., Kanki, Y., Li, G., Poh, H.-M., Mimura, I., Kobayashi, M., Taguchi, A., Maejima, T., ichi Suehiro, J., Sugiyama, A., Kaneki, K., Aruga, H., Dong, S., Stevens, J. F., Yamamoto, S., Tsutsumi, S., Fujita, T., Ruan, X., Aburatani, H., Nangaku, M., Ruan, Y., Kodama, T., and Wada, Y. (2014). Cross-enhancement of ANGPTL4 transcription by HIF1  $\alpha$  and PPAR  $\beta/\delta$  is the result of the conformational proximity of two response elements. *Genome Biology*, 15(4):R63.
- [44] Ishii, J., Nomura, M., Ito, M., Naruse, H., Mori, Y., hua Wang, J., Ishikawa, T., Kurokawa, H., Kondo, T., Nagamura, Y., Ezaki, K., Watanabe, Y., and Hishida, H.

- (2000). Plasma concentration of brain natriuretic peptide as a biochemical marker for the evaluation of right ventricular overload and mortality in chronic respiratory disease. *Clinica Chimica Acta*, 301(1-2):19–30.
- [45] Kahnert, K., Lucke, T., Huber, R. M., Behr, J., Biertz, F., Vogt, A., Watz, H., Alter, P., Fähndrich, S., Bals, R., Holle, R., Karrasch, S., Söhler, S., Wacker, M., Ficker, J. H., Parhofer, K., Vogelmeier, C., and Jörres, R. A. (2017). Relationship of hyperlipidemia to comorbidities and lung function in COPD: results of the COSYCONET cohort. In *Epidemiology*. European Respiratory Society.
- [46] Karch, A., Vogelmeier, C., Welte, T., Bals, R., Kauczor, H.-U., Biederer, J., Heinrich, J., Schulz, H., Gläser, S., Holle, R., Watz, H., Korn, S., Adaskina, N., Biertz, F., Vogel, C., Vestbo, J., Wouters, E. F., Rabe, K. F., Söhler, S., Koch, A., and Jörres, R. A. (2016). The german COPD cohort COSYCONET: Aims, methods and descriptive analysis of the study population at baseline. *Respiratory Medicine*, 114:27–37.
- [47] Kardos, P., Vogelmeier, C., and Worth, H. (2012). Der neue GOLD-Bericht 2011. *Pneumologie*, 66(08):493–496.
- [48] Katano, H. and Yamada, K. (2014). Upregulation of ANGPTL4 messenger RNA and protein in severely calcified carotid plaques. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23(5):933–947.
- [49] Kempf, T., von Haehling, S., Peter, T., Allhoff, T., Cicoira, M., Doehner, W., Ponikowski, P., Filippatos, G. S., Rozentryt, P., Drexler, H., Anker, S. D., and Wollert, K. C. (2007). Prognostic utility of growth differentiation factor-15 in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 50(11):1054–1060.
- [50] Kempf, T. and Wollert, K. C. (2009). Growth differentiation factor-15: a new biomarker in cardiovascular disease. *Herz*, 34(8):594–599.
- [51] Kersten, S., Mandard, S., Tan, N. S., Escher, P., Metzger, D., Chambon, P., Gonzalez, F. J., Desvergne, B., and Wahli, W. (2000). Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *Journal of Biological Chemistry*, 275(37):28488–28493.
- [52] Klinger, J. R., Warburton, R. R., Pietras, L., and Hill, N. S. (1998). Brain natriuretic peptide inhibits hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Journal of Applied Physiology*, 84(5):1646–1652.
- [53] Lambrecht, S., Smith, V., Wilde, K. D., Coudenys, J., Decuman, S., Deforce, D., Keyser, F. D., and Elewaut, D. (2014). Growth differentiation factor 15, a marker of lung involvement in systemic sclerosis, is involved in fibrosis development but is not indispensable for fibrosis development. *Arthritis & Rheumatology*, 66(2):418–427.
- [54] Lang, C. C., Coutie, W. J., Struthers, A. D., Dhillon, D. P., Winter, J. H., and Lipworth, B. J. (1992). Elevated levels of brain natriuretic peptide in acute hypoxaemic chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Science*, 83(5):529–533.

- [55] Lankeit, M., Kempf, T., Dellas, C., Cuny, M., Tapken, H., Peter, T., Olschewski, M., Konstantinides, S., and Wollert, K. C. (2008). Growth differentiation factor-15 for prognostic assessment of patients with acute pulmonary embolism. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 177(9):1018–1025.
- [56] Leco, K. J., Waterhouse, P., Sanchez, O. H., Gowing, K. L., Poole, A. R., Wakeham, A., Mak, T. W., and Khokha, R. (2001). Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *Journal of Clinical Investigation*, 108(6):817–829.
- [57] Lind, L., Wallentin, L., Kempf, T., Tapken, H., Quint, A., Lindahl, B., Olofsson, S., Venge, P., Larsson, A., Hulthe, J., Elmgren, A., and Wollert, K. C. (2009). Growth-differentiation factor-15 is an independent marker of cardiovascular dysfunction and disease in the elderly: results from the prospective investigation of the vasculature in uppsala seniors (PIVUS) study. *European Heart Journal*, 30(19):2346–2353.
- [58] Mandard, S., Zandbergen, F., van Straten, E., Wahli, W., Kuipers, F., Müller, M., and Kersten, S. (2005). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *Journal of Biological Chemistry*, 281(2):934–944.
- [59] Mannino, D. M., Thorn, D., Swensen, A., and Holguin, F. (2008). Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *European Respiratory Journal*, 32(4):962–969.
- [60] McMurray, J. J., Adamopoulos, S., Anker, S. D., Auricchio, A., Böhm, M., Dickstein, K., Falk, V., Filippatos, G., Fonseca, C., Gomez-Sanchez, M. A., Jaarsma, T., Køber, L., Lip, G. Y., Maggioni, A. P., Parkhomenko, A., Pieske, B. M., Popescu, B. A., Rønnevik, P. K., Rutten, F. H., Schwitter, J., Seferovic, P., Stepinska, J., Trindade, P. T., Voors, A. A., Zannad, F., Zeiher, A., Bax, J. J., Baumgartner, H., Ceconi, C., Dean, V., Deaton, C., Fagard, R., Funck-Brentano, C., Hasdai, D., Hoes, A., Kirchhof, P., Knuuti, J., Kolh, P., McDonagh, T., Moulin, C., Popescu, B. A., Reiner, Ž., Sechtem, U., Sirnes, P. A., Tendera, M., Torbicki, A., Vahanian, A., Windecker, S., McDonagh, T., Sechtem, U., Bonet, L. A., Avraamides, P., Lamin, H. A. B., Brignole, M., Coca, A., Cowburn, P., Dargie, H., Elliott, P., Flachskampf, F. A., Guida, G. F., Hardman, S., Iung, B., Merkely, B., Mueller, C., Nanas, J. N., Nielsen, O. W., Ørn, S., Parissis, J. T., and Ponikowski, P. (2012). ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012. *European Journal of Heart Failure*, 14(8):803–869.
- [61] Mueller, C., Scholer, A., Laule-Kilian, K., Martina, B., Schindler, C., Buser, P., Pfisterer, M., and Perruchoud, A. P. (2004). Use of b-type natriuretic peptide in the evaluation and management of acute dyspnea. *New England Journal of Medicine*, 350(7):647–654.
- [62] Murata, M., Yudo, K., Nakamura, H., Chiba, J., Okamoto, K., Suematsu, N., Nishioka, K., Beppu, M., Inoue, K., Kato, T., and Masuko, K. (2009). Hypoxia upregulates the expression of angiopoietin-like-4 in human articular chondrocytes:

- Role of angiopoietin-like-4 in the expression of matrix metalloproteinases and cartilage degradation. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(1):50–57.
- [63] Mutlu, L. C., Altintas, N., Aydin, M., Tulubas, F., Oran, M., Kucukyalin, V., Kaplan, G., and Gurel, A. (2015). Growth differentiation factor-15 is a novel biomarker predicting acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*, 38(5):1805–1813.
- [64] Nagaya, N., Nishikimi, T., Uematsu, M., Satoh, T., Kyotani, S., Sakamaki, F., Kakishita, M., Fukushima, K., Okano, Y., Nakanishi, N., Miyatake, K., and Kangawa, K. (2000). Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*, 102:865–870.
- [65] Nikolakopoulou, S., Hillas, G., Perrea, D., Tentolouris, N., Loukides, S., Kostikas, K., Simoes, D., Georgakopoulou, E., Vogiatzakis, E., Veldekis, D., and Bakakos, P. (2013). Serum angiopoietin-2 and CRP levels during COPD exacerbations. *COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 11(1):46–51.
- [66] NO, S., KE, S., NG, M., and et al. (2016). Coding Variation in ANGPTL4, LPL, and SVEP1 and the Risk of Coronary Disease. *New England Journal of Medicine*, 374(19):1898–1898.
- [67] Nouredine, H., Gary-Bobo, G., Alifano, M., Marcos, E., Saker, M., Vienney, N., Amsellem, V., Maitre, B., Chaouat, A., Chouaid, C., Dubois-Rande, J.-L., Damotte, D., and Adnot, S. (2011). Pulmonary artery smooth muscle cell senescence is a pathogenic mechanism for pulmonary hypertension in chronic lung disease. *Circulation Research*, 109(5):543–553.
- [68] Pinto, N. I., Carnier, J., Oyama, L. M., Otoch, J. P., Alcântara, P. S., Tokeshi, F., and Nascimento, C. M. (2015). Cancer as a proinflammatory environment: Metastasis and cachexia. *Mediators of Inflammation*, 2015:1–13.
- [69] Praticò, D., Basili, S., Vieri, M., Cordova, C., Violi, F., and Fitzgerald, G. (1998). Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with an Increase in Urinary Levels of Isoprostane F<sub>2α</sub>-III, an Index of Oxidant Stress. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 158(6):1709–1714.
- [70] R. Bals, T. K. (2010). *Alpha-1-Antitrypsin-Mangel: Pathophysiologie, Diagnose und Therapie*. Thieme, 1. auflage edition.
- [71] R&D Systems, I. (2018). *Magnetic Luminox® Assay - Human Premixed Multi-Analyte Kit*. R&D Systems, Inc., 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413, 752885.12 edition.
- [72] Reimund, M., Kovrov, O., Olivecrona, G., and Lookene, A. (2016). Lipoprotein lipase activity and interactions studied in human plasma by isothermal titration calorimetry. *Journal of Lipid Research*, 58(1):279–288.
- [73] Renz-Polster, H. and Krautzig, S. (2013). *Basislehrbuch Innere Medizin*. Urban & Fischer bei Elsev, 5. auflage edition.

- [74] Repine, J., Bast, A., and Lankhorst, I. (1997). Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 156(2):341–357.
- [75] Rogers, D. F. (2000). Mucus pathophysiology in COPD: differences to asthma, and pharmacotherapy. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace*, 55:324–332.
- [76] Salerno, D. and Marik, P. E. (2011). Brain natriuretic peptide measurement in pulmonary medicine. *Respiratory Medicine*, 105(12):1770–1775.
- [77] Salvi, S. S. and Barnes, P. J. (2009). Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *The Lancet*, 374(9691):733–743.
- [78] Santos, S., Peinado, V., Ramírez, J., Melgosa, T., Roca, J., Rodriguez-Roisin, R., and Barberà, J. (2002). Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *European Respiratory Journal*, 19(4):632–638.
- [79] Schlittenhardt, D., Schober, A., Strelau, J., Bonaterra, G. A., Schmiedt, W., Unsicker, K., Metz, J., and Kinscherf, R. (2004). Involvement of growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 (GDF-15/MIC-1) in oxLDL-induced apoptosis of human macrophages in vitro and in arteriosclerotic lesions. *Cell and Tissue Research*, 318(2):325–333.
- [80] Schodel, J., Oikonomopoulos, S., Ragoussis, J., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., and Mole, D. R. (2011). High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*, 117(23):e207–e217.
- [81] Scholz, A., Plate, K. H., and Reiss, Y. (2015). Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1347(1):45–51.
- [82] Schwarz, S., Lehnigk, B., and Schwittai, W. (2017). *Lungenfunktionsdiagnostik und Spiroergometrie*. Thieme Georg Verlag.
- [83] Sethi, S. and Murphy, T. F. (2001). Bacterial Infection in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in 2000: a State-of-the-Art Review. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2):336–363.
- [84] Soler-Cataluna, J. J. (2005). Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax*, 60(11):925–931.
- [85] Stolz, D., Breidthardt, T., Christ-Crain, M., Bingisser, R., Miedinger, D., Leuppi, J., Mueller, B., Tamm, M., and Mueller, C. (2008). Use of b-type natriuretic peptide in the risk stratification of acute exacerbations of COPD. *Chest*, 133(5):1088–1094.
- [86] Strimbu, K. and Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6):463–466.



- [87] Sukonina, V., Lookene, A., Olivecrona, T., and Olivecrona, G. (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(46):17450–17455.
- [88] Tacheva, T., Dimov, D., Aleksandrova, E., Bialecka, M., Gulubova, M., and Vlaykova, T. (2017). The G allele of MMP12 -82 A > G promoter polymorphism as a protective factor for COPD in Bulgarian population. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 123(5):371–376.
- [89] Teo, Z., Chan, J. S. K., Chong, H. C., Sng, M. K., Choo, C. C., Phua, G. Z. M., Teo, D. J. R., Zhu, P., Choong, C., Wong, M. T. C., and Tan, N. S. (2017). Angiopoietin-like 4 induces a  $\beta$ -catenin-mediated upregulation of ID3 in fibroblasts to reduce scar collagen expression. *Sci. Rep.*, 7(1).
- [90] Thomsen, M., Ingebrigtsen, T. S., Marott, J. L., Dahl, M., Lange, P., Vestbo, J., and Nordestgaard, B. G. (2013). Inflammatory biomarkers and exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *JAMA*, 309(22):2353.
- [91] Tjeerdema, N., Georgiadi, A., Jonker, J. T., van Glabbeek, M., Dehnavi, R. A., Tamsma, J. T., Smit, J. W. A., Kersten, S., and Rensen, P. C. N. (2014). Inflammation increases plasma angiopoietin-like protein 4 in patients with the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, 2(1):e000034.
- [92] Trovik, J., Salvesen, H. B., Cuppens, T., Amant, F., and Staff, A. C. (2014). Growth differentiation factor-15 as biomarker in uterine sarcomas. *International Journal of Gynecological Cancer*, 24(2):252–259.
- [93] Tudor, R. M. and Petrache, I. (2012). Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Clinical Investigation*, 122(8):2749–2755.
- [94] Tudoric, N., Koblizek, V., Miravitlles, M., Valipour, A., Milenkovic, B., Barczyk, A., Somfay, A., Zykov, K., Kostov, K., Zbozinkova, Z., Svoboda, M., Sorli, J., Krams, A., and Tkacova, R. (2017). GOLD 2017 on the way to a phenotypic approach? Analysis from the Phenotypes of COPD in Central and Eastern Europe (POPE) Cohort. *European Respiratory Journal*, 49(4):1602518.
- [95] Tulevski, I. I. (2001). Increased brain and atrial natriuretic peptides in patients with chronic right ventricular pressure overload: correlation between plasma neurohormones and right ventricular dysfunction. *Heart*, 86(1):27–30.
- [96] Ukena, C., Mahfoud, F., Kindermann, M., Kindermann, I., Bals, R., Voors, A. A., van Veldhuisen, D. J., and Böhm, M. (2010). The cardiopulmonary continuum systemic inflammation as ‘common soil’ of heart and lung disease. *International Journal of Cardiology*, 145(2):172–176.
- [97] Vestbo, J., Hurd, S. S., Agustí, A. G., Jones, P. W., Vogelmeier, C., Anzueto, A., Barnes, P. J., Fabbri, L. M., Martinez, F. J., Nishimura, M., Stockley, R. A., Sin, D. D., and Rodriguez-Roisin, R. (2013). Global strategy for the diagnosis,

- management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 187(4):347–365.
- [98] Vocka, M., Langer, D., Fryba, V., Petrtyl, J., Hanus, T., Kalousova, M., Zima, T., and Petruzalka, L. (2018). Growth/differentiation factor 15 (gdf-15) as new potential serum marker in patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 21:869–874.
- [99] Vogelmeier, C., Buhl, R., Burghuber, O., Criée, C.-P., Ewig, S., Godnic-Cvar, J., Hartl, S., Herth, F., Kardos, P., Kenn, K., Nowak, D., Rabe, K. F., Studnicka, M., Watz, H., Welte, T., Windisch, W., and Worth, H. (2018). S2k - Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungemphysem (COPD). [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/020-0061\\_S2k\\_COPD\\_chronisch-obstruktive-Lungenerkrankung\\_2018-01.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-0061_S2k_COPD_chronisch-obstruktive-Lungenerkrankung_2018-01.pdf).
- [100] Wacker, M., Kitzing, K., Jörres, R., Leidl, R., Schulz, H., Karrasch, S., Karch, A., Koch, A., Vogelmeier, C., and Holle, R. (2017). The contribution of symptoms and comorbidities to the economic impact of COPD: an analysis of the german COSYCONET cohort. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, Volume 12:3437–3448.
- [101] Wacker, M. E., Jörres, R. A., Karch, A., Koch, A., Heinrich, J., Karrasch, S., Schulz, H., Peters, A., Gläser, S., Ewert, R., Baumeister, S. E., Vogelmeier, C., Leidl, R., and Holle, R. (2016). Relative impact of COPD and comorbidities on generic health-related quality of life: a pooled analysis of the COSYCONET patient cohort and control subjects from the KORA and SHIP studies. *Respiratory Research*, 17(1).
- [102] Wang, T. J., Larson, M. G., Levy, D., Benjamin, E. J., Leip, E. P., Omland, T., Wolf, P. A., and Vasan, R. S. (2004). Plasma natriuretic peptide levels and the risk of cardiovascular events and death. *New England Journal of Medicine*, 350(7):655–663.
- [103] Waschki, B., Kirsten, A., Holz, O., Meyer, T., Lichtinghagen, R., Rabe, K., Magnussen, H., Welte, T., Watz, H., and Janciauskiene, S. (2016). Angiopoietin-like protein 4 and cardiovascular function in COPD. *BMJ Open Respiratory Research*, 3(1):e000161.
- [104] WHO (2018a). Burden of COPD. <http://www.who.int/respiratory/copd/burden/en/>. Aufgerufen am 6. Februar 2018.
- [105] WHO (2018b). COPD: Definition. <http://www.who.int/respiratory/copd/definition/en/>. Aufgerufen am 05.03.2018.
- [106] Wollert, K. C., Kempf, T., Peter, T., Olofsson, S., James, S., Johnston, N., Lindahl, B., Horn-Wichmann, R., Brabant, G., Simoons, M. L., Armstrong, P. W., Califf, R. M., Drexler, H., and Wallentin, L. (2007). Prognostic value of growth-differentiation factor-15 in patients with non-ST-elevation acute coronary syndrome. *Circulation*, 115(8):962–971.

- [107] Worth, H. (2015). Nationale VersorgungsLeitlinie COPD. Wesentliche Inhalte und neuere Entwicklungen im Management der Erkrankung. <http://www.bayerisches-aerzteblatt.de/inhalte/details/news/detail/News/nationale-versorgungsleitlinie-copd-wesentliche-inhalte-und-neuere-entwicklungen-im-management-der.html>. Aufgerufen am ???.? 2018.
- [108] Wu, Q., Jiang, D., and Chu, H. W. (2011). Cigarette smoke induces growth differentiation factor 15 production in human lung epithelial cells: Implication in mucin over-expression. *Innate Immunity*, 18(4):617–626.
- [109] Zemans, R. L., Jacobson, S., Keene, J., Kechris, K., Miller, B. E., Tal-Singer, R., and Bowler, R. P. (2017). Multiple biomarkers predict disease severity, progression and mortality in COPD. *Respiratory Research*, 18(1).



# Anhang

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. Robert Bals danke ich für die Möglichkeit, an der nationalen COSYCONET Studie mitzuarbeiten, für die Bereitstellung des Themas und die fachliche Betreuung. Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Dr. Sebastian Fähndrich für das Heranführen an das wissenschaftliche Arbeiten und für die engagierte Unterstützung bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Ganz besonders danke ich auch Jakob Schöpe vom Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik (IMBEI) für die biometrische Betreuung und die maßgebliche Unterstützung bei der Auswertung meiner Daten.

Dank gebührt Herrn Dr. Christian Herr und Frau Victoria Weinhold, die meine Arbeit im Labor hilfreich unterstützt haben und immer eine freundliche Atmosphäre geschaffen haben.

Johannes Hochreiter danke ich für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung und das Durchhaltevermögen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern aus tiefstem Herzen dafür danken, dass sie mir das Medizinstudium ermöglicht haben, stets an mich glauben und mir immer ein großes Vorbild sein werden. Ich danke Ihnen für die Neugierde, die sie mir vorgelebt haben und die mich mein Leben lang begleiten wird.